

SÉRIE N°
N° D'ORDRE :

THÈSES

PRÉSENTÉES
A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
POUR OBTENIR
LE TITRE DE DOCTEUR INGÉNIEUR

PAR
R. BILLAZ
Ingénieur Agronome

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE DU MODE D'ACTION PHYSIOLOGIQUE
DES PHÉNYL-3-ALKYL-5-OXAZOLIDINE-
DIONE-2.4 HERBICIDES.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté :
LA PHOSPHORYLATION PHOTOSYNTHÉTIQUE

Soutenues le 20 Février 1964 devant la Commission d'examen.

MM. ULRICH
LEDERER
LIORET

Président
} Examinateurs.

Imprimerie Alençonnaise
Place Poulet-Malassis
— 61 - Alençon —

SÉRIE N°
N° D'ORDRE :

THÈSES

PRÉSENTÉES
A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
POUR OBTENIR
LE TITRE DE DOCTEUR INGÉNIEUR

PAR
R. BILLAZ
Ingénieur Agronome

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE DU MODE D'ACTION PHYSIOLOGIQUE
DES PHÉNYL-3-ALKYL-5-OXAZOLIDINE-
DIONE-2.4 HERBICIDES.

2^e THÈSE. — Propositions données par la Faculté :
LA PHOSPHORYLATION PHOTOSYNTHÉTIQUE

Soutenues le 20 Février 1964 devant la Commission d'examen.

MM. ULRICH
LEDERER
LIORET

Président
} *Examineurs.*

Imprimerie Alençonnaise
Place Poulet-Malassis
— 61 - Alençon —



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen M. Zamansky

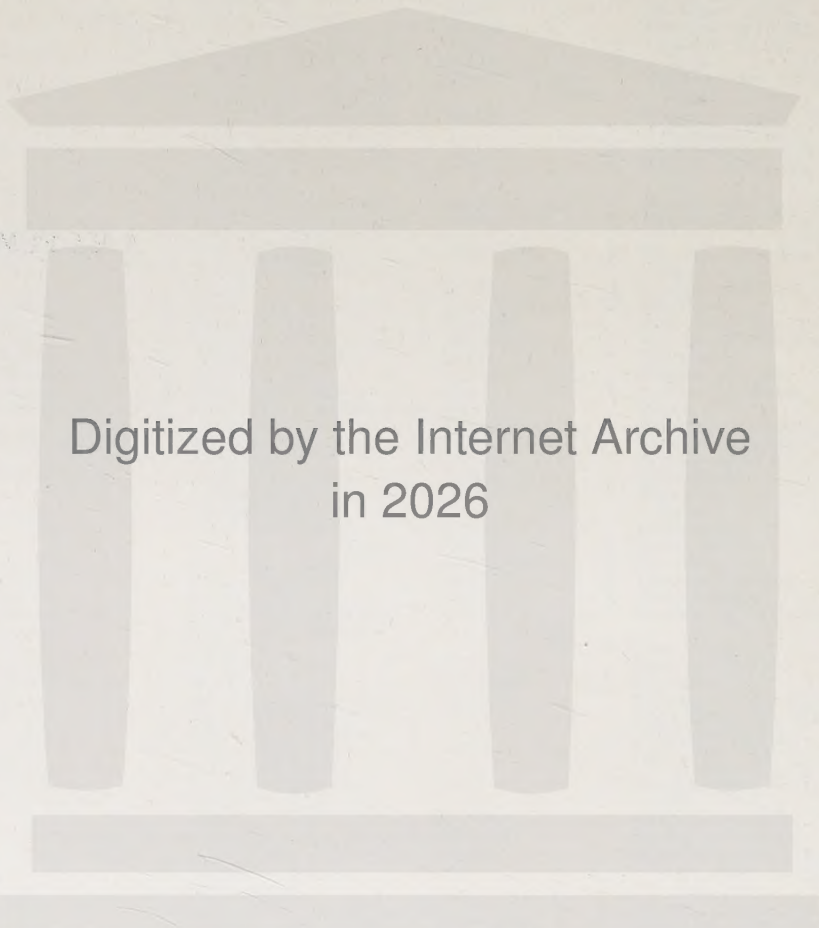
MONNIER	T	Physiologie générale	AMIEL	T	Chimie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie	HOCART	T	Minéralogie et Cristallog.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)	MATHIEU J.P.	T	Physique optique
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)	COUTEAUX	T	Cytologie
LAFFITTE	T	Chimie générale	MAY	T	Zoologie
FAVARD	T	Géométrie supérieure	CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
COULOMB	T	Physique du globe	FELDMANN	T	Biologie végétale marine
COUSIN (Mlle)	T	Biologie animale (S. P.C.N.)	GUINIER	T	Physique des solides (Orsay)
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale	JOST	T	Physiologie comparée
DRACH	T	Zoologie	FORTET	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)	SCHWARTZ	T	Calcul diff. et intégral
EPHRUSSI	T	Génétique	CHOUARD	T	Physiologie végétale
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.) et sédiment (Orsay)	MALAVARD	T	Aviation (Techn. Aéro-naut.)
GAUTHERET	T	Biologie végétale P.C.B.	BRELOT	T	Calcul diff. et intégral
LUCAS R.	T	Recherches physiques	NORMANT	T	Chimie organique
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire	BÉNARD	T	Chimie minérale
ARNULF	T	Optique appliquée	BUVAT	T	Botanique (E.N.S.)
MORAND	T	Physique enseignement	DUGUÉ	T	Statistiques mathématiques
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)	SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
FORTIER	T	Mécanique Exp. des Fluides	ULRICH	T	Physiologie végétale appli.
PETIT	T	Biologie maritime	MARÉCHAL	T	Optique théori. et appli.
QUENEY	T	Météo et dynamique atmosphérique	KIRRMANN	T	Théories chimiques
GALLIEN	T	Embryologie	CHADEFAUD	T	Botanique
EICHORN	T	Botanique	LE BRETON (Mlle)	T	Physio. de la nutrition
DE CUGNAC	T	Biologie vég. (S.P.C.N.)	LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie
CAUCHOIS (Mlle)	T	Chimie physique	DEVILLERS	T	Anatomie et Histol. comp.
THELLIER	T	Physique du globe	EHRESMANN	T	Topologie algébrique
L'HÉRITIER	T	Biologie génér. (Orsay)	FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)	GLANGEAUD	T	Géographie phys. et géol.
PONCIN	T	Mécanique générale	GODEMENT	T	Mathématiques (M.C.P.)
DU BREIL	T	Arithm. et théorie des nombres	PISOT	T	Tech. Mathém. de la Phys.
QUELET	T	Chimie organique	ROCH	T	Géologie
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée	SCHATZMANN	T	Astrophysique
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire	TERMIER	T	Géologie générale
CUVILLIER	T	Micropaléontologie	ZAMANSKY	T	Mathématiques générales
JUNG	T	Géologie	LENNUIER	T	Physique (M.G.P.)
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique	RIZET	T	Génétique (Orsay)
WIEMANN	T	Chimie organique et struc.	ROUTHIER	T	Géologie appliquée
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay)	TONNELAT M ^{me}	T	Physique théorique
VASSY	T	Physique de l'atmosphère	DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.)
DESTOUCHES	T	Théorie physique	SOUCHAY	T	Chimie générale
DUBOIS J.E.	T	Chimie organique	AIGRAIN	T	Électrotechnique génér.
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.)	BRUSSET	T	Chimie systématique
MICHEL A.	T	Chimie minérale (Orsay)	LEVY M	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
OLMER	T	Énergétique générale	CHAIX M ^{me}	T	Chimie biologique
ROUAULT	T	Électricité (Orsay)	HUREL-PY M ^{me}	T	Biologie végétale (P.C.B.)
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée	PLAUX	T	Chimie (M.P.C.)
BARCHIEWITZ	T	Chimie physique	BRUN	T	Mécanique théorique des fluides I
BROSSEL	T	Physique atomique	LEDERER	T	Chimie biologique (Orsay)
BUSER	T	Physiologie comparée	DUBREIL M ^{me}	T	Mathématiques (Agrég.)
CAMUS	T	Physiol. végétale	LELONG M ^{me}	T	Math. II (E.N.S.)
CASTAING	T	Physique II Thermod. (Orsay)	BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.)
CURIEN	T	Minéralo et Cristallog.	COTTE	T	Physique électricité
MOYSE	T	Physiologie végét. (Orsay)	JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure
NOIROT	T	Évolution des Êtres Org.	PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparée
PANNETIER	T	Chimie générale	GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés
POSSOMPES	T	Zoologie	PRÉVOST	T	Chimie organique
PULLMANN	T	Chimie quantique	WYART	T	Minéralo et Cristallog.
TEILLAC	T	Physique nucl. et radio-activité	TEISSIER	T	Zoologie
TONNELAT	T	Biologie physico-chim.	MANGENOT	T	Biologie vég. Orsay
VILLE	T	Économetrie	AUGER	T	Physique quantique et relativité
WILLEMART	T	Chimie (P.C.B.)			
DODE	T	Chimie (Orsay)			
FREYMANN	T	Recherches physiques			

GUINOCHE T . . .	T	Biol. vég. (S.P.C.N.) (Orsay)	CORABŒUF . . .	Physiologie animale (Orsay)
ROLLET . . .	T	Chimie minérale	DELLOUÉ . . .	Physique de l'exosphère
JOSIEN M ^{lle} . . .	T	Chimie (S.P.C.N.)	GORENFLOT . . .	Botanique II (Orsay)
CHEVALLEY . . .	T	Géométrie algéb. et théorie des groupes	HOUILLO . . .	Biologie animale (P.C.B.)
ARNOULT . . .	T	Électronique (Orsay)	JULLIEN J. . .	Chimie S.P.C.N. (Orsay)
CHAPELLE . . .	T	Physique (Orsay)	MALGRANGE . . .	T Technique math. de la Physique (Orsay)
DELANGE . . .	T	Mathématiques I (Orsay)	OLIVIER . . .	Antropologie
DENY . . .	T	Mathémat. génér. (Orsay)	NOZERAN . . .	T Botanique II (Orsay)
GERMAIN . . .	T	Mécan. théor. des fluides	BLANC-LAPIERRE . .	T Physique (E.N.S.) (Orsay)
LUCAS G . . .	T	Géologie	CHEVAUGEON . . .	T Botanique (Orsay)
ALLARD . . .	T	Chimie physique	KAHANE . . .	T Mathématiques (Orsay)
BERTHELOT . . .	T	Physique des particules fondamentales	SAMUEL . . .	T Mathém. (E.N.S.) féminines
BRICART . . .	T	Météor. et Phys. de l'Atmosphère	KOURGANOFF . . .	T Astronomie (Orsay)
ALBE-FESSARD M ^{me} . .	T	Psychophysiologie	THIRY . . .	T Mécanique céleste
FRIEDEL . . .	T	Physique des solides (Orsay)	ABELES . . .	Physique (S.P.C.N.)
JULIA M. . .	T	Études des molécules naturelles complexes	AMAT . . .	T Physique (P.C.B.)
LENDER . . .	T	Biologie anim. (S.P.C.N. (Orsay)	AUBOIN . . .	T Géologie
MAGAT . . .	T	Physico-Chimie des radio-éléments	BENOIT-GUEUTAL M ^{me} . .	Physique nucl. et radio-activité
QUINTIN M ^{lle} . . .	T	Électrochimie	BOUGIS . . .	Biologie marine (Villefranche-sur-Mer)
MONOD . . .	T	Chimie du métabolisme	BRUHAT . . .	T Mathématique (P.M.C.)
BENOIT . . .	T	Physiol. anim. (Orsay)	BRUNN . . .	T Géologie historique (Orsay)
DE POSSEL . . .	T	Analyse numérique	CHABBAL . . .	Physique M.G.P. (Orsay)
CHARLOT . . .	T	Chimie analytique	DEHEUVELS . . .	T Mathématique Prop. (Orsay)
LEMÉE . . .	T	Écologie (B.M.P. V.) (Orsay)	D'ESPAIGNAT . . .	T Physique théorique (Orsay)
GUÉRIN . . .	T	Chimie (M.P.C.) (Orsay)	FURON . . .	T Géologie (S.P.C.N.)
CHATELET M. . .	T	Chimie (P.C.B.)	GANS M ^{me} . . .	T Génétique
JEAN . . .	T	Physique nucléaire (Orsay)	GENEVES . . .	Biologie végétale (P.C.B.)
MATTLER . . .	T	Physique (S.P.C.N.)	GUILBERT . . .	Physique (C.U.S. Orléans)
BERGERARD . . .	T	Zoologie (Orsay)	HUPE . . .	Pétrographie
BERTEIN . . .	T	Électronique (Orsay)	HOLLANDE . . .	T Biologie générale
BOUSSIÈRES . . .	T	Chimie des radioéléments (Orsay)	LIONS . . .	T Analyse numérique
COUTURE M ^{me} . . .	T	Thermodynamique et Méc. Physique	MAITTE . . .	Chimie (P.C.B.)
ELLENBERGER . . .	T	Géologie des grandes régions du globe	MEYER . . .	Physique propédeutique
FRANC . . .	T	Biologie animale (P.C.B.)	NICOLAS . . .	Géologie appliquée
SCHNELL . . .	T	Botanique tropicale (Orsay)	PANTOEL . . .	Biologie générale
STOLKOWSKI . . .	T	Physiologie végétale	RAVIER . . .	Pétrographie
ACHER . . .	T	Chimie biologique	ROSEAU . . .	T Mécanique théor. des fluides
BAUDOIN . . .	T	Biologie animale (P.C.B.)	ROUBINE . . .	Électronique
BEAUMONT . . .	T	Biologie animale (S.P.C.N.)	SILBER . . .	T Chimie (P.C.B.)
BLAMONT . . .	T	Géophysique ionosphère	UEBERSFELD . . .	T Electronique
BOUREAU . . .	T	Botanique	YVON . . .	T Théories physiques
CURIE D. . .	T	Physique (M.G.P.)	HERVÉ . . .	T Mathématiques
FRÉAND-DELGA . . .	T	Géologie	NÉRON . . .	T Mathém. (M.P.C.) (Orsay)
DEURON . . .	T	Chimie organique (Orsay)	PECKER-WIMEL M ^{me} . .	T Astrophysique
HELLER . . .	T	Physiologie végétale	BALKANSKY . . .	Physique (M.P.C.)
TORTRAT . . .	T	Calcul des probabilités	LE CORRE . . .	T Électricité
CALLEUX . . .	T	Géologie (S.P.C.N.)	DELCROIX . . .	T Physique théor. (Orsay)
MAGNAN . . .	T	Physique (S.P.C.N.)	GOURDIN . . .	Phys. théor. des Hautes-Énergies (Orsay)
DAUDEL . . .	T	Mécanique ondulatoire	LEHMANN . . .	T Phys. exp. des Hautes-Énergies (Orsay)
FOURCROY M ^{lle} . . .	T	Biologie végétale (S.P.C.N.)	NATAF . . .	T Physique nucl. et radio-activité (Orsay)
CHOQUET-BRUHAT M ^{me} . .	T	Mécan. analytique et mécan. céleste	ECHALIER . . .	Biologie animale (P.C.B.)
VEIL M ^{lle} . . .	T	Physiologie générale	BARRAUD . . .	Physiologie cellulaire
LWOFF . . .	T	Microbiologie	LIOTET . . .	Physiologie végét. (Orsay)
SIESTRUNK . . .	T	Mécan. phys. et expér.	DARS . . .	Géologie struc. et Géol. appliquée
LACOMBE . . .	T	Métallurg. des métaux nucléaires	CAMEFORT . . .	T Botanique (aggrégation)
BROCHARD . . .	T	Physique (P.C.B.) (Orsay)	VICHNIEWSKY . . .	T Mécanique industrielle
CABANNES . . .	T	Mécanique générale	BLAQUIÈRE . . .	Électronique (Orsay)
LESIEUR . . .	T	Mathématiques-I (Orsay)	ARNOUS . . .	T Physique théorique
MAZET . . .	T	Mécanique générale (Orsay)	TATIBOUET . . .	Chimie (C.S.U. Orléans)
CAIRE . . .	T	Géographie phys. et Géolog. dynamique	MALLIAVIN . . .	T Mathém. prop. (Orsay)
COMOLET . . .	T	Mécanique des fluides	GAUDEMAR . . .	Chimie prop. (Orsay)
			PÉREZ Y JORBA . . .	Phys. exp. des Hautes-Énergies (Orsay)
			DAVID . . .	T Chimie (Agrég. Orsay)
			BROUSSE . . .	T Mécanique théorique

Le Secrétaire Général :

R. POULAIN.

A MA FEMME



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552208_0071

Qu'il nous soit permis d'exprimer à M. Guy GARNIER, Chef du Service d'Entomologie et de Biologie Végétale du Centre d'Études du Bouchet, notre profonde reconnaissance pour l'appui constant et l'amitié éclairée qu'il nous a témoignés. Notre gratitude va également à M. RICAUD, Directeur adjoint du C.E.B. pour les facilités qu'il nous a accordées, ainsi qu'à M. TERNIER, Directeur du Centre, et à M. le Directeur des Poudres, qui ont bien voulu autoriser ce travail.

A chaque étape de notre recherche M. Georges MOREL, Directeur de Recherches au Centre National de la Recherche Agronomique, nous a guidé et conseillé, nous faisant largement profiter de son expérience scientifique : nous lui en disons ici notre gratitude.

Que MM. les Professeurs ULRICH et LEDERER, ainsi que M. LIORET, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences d'Orsay, acceptent nos sincères remerciements pour l'honneur qu'il nous ont fait en acceptant de faire partie de notre jury.

Nous remercions également M. le Professeur ROSENBERG pour l'accueil qu'il nous a réservé et les précieux conseils qu'il nous a donnés pour la réalisation des expériences concernant les phosphorylations oxydatives.

Nous remercions particulièrement M. J. BOVE, chef du Service de Biochimie à l'I.F.A.C., qui nous a accueilli dans son laboratoire pour réaliser les expériences relatives à la photosynthèse *in vitro*, ainsi que M. A. GOFFEAU qui nous a initié à ce genre de recherches : leur expérience dans ce domaine nous a été précieuse.

Notre reconnaissance s'adresse enfin au personnel de notre laboratoire, pour l'aide technique dévouée qu'il nous a apportée au cours de ce travail.

INTRODUCTION	9
1° Historique des études sur le mode d'action des principaux herbicides. .	11
A. Études du mode d'action des herbicides sur les espèces sensibles. .	11
B. Études de la résistance	13
2° Limites de notre étude	13
3° Plan du mémoire	14
Chapitre I: MATÉRIEL ET MÉTHODES.	15
1° Matériel végétal	15
2° Traitements herbicides	15
3° Observations histologiques	16
4° Fixation de $^{14}\text{CO}_2$ par les plantes entières.	17
5° Action in vitro sur les chloroplastes isolés.	17
a) Préparation des chloroplastes.	17
b) Déroulement des réactions lumineuses	18
c) Mesures des réactions photochimiques	19
d) Chromatographie des extraits après fixation de $^{14}\text{CO}_2$	20
6° Action in vitro sur des mitochondries de foie de rat et sur les mitochondries d'hypocotyles étiolés de concombres	20
a) Expérience sur foie de rat	20
b) Expériences sur hypocotyles étiolés de concombres	21
7° Analyse de la composition en acides aminés libres et liés, acides carboxyliques, sucres solubles et amidon des plantes traitées	23
a) Dosage de l'amidon	23
b) Dosage de l'azote total et de l'azote nitrique	24
c) Extraction et dosage des acides aminés, des acides carboxyliques non volatils et des sucres solubles.	25
Chapitre II: PHYTOTOXICITÉ DES PHÉNYL-3-ALKYL-5-OXAZOLIDINE-DIONE-2,4. .	27
1° Mesure de la phytotoxicité	28
2° Symptômes présentés par les plantes traitées	33
3° Voies de pénétration	36
Chapitre III: ACTION MITOCLASIQUE	37
1° Inhibition de la croissance	37
2° Observations histologiques	38
3° Conclusion	41

Chapitre IV: INHIBITION DE LA CROISSANCE DE PLANTULES DE SOJA PAR LA PARACHLOROPHÉNYL-3-ÉTHYL-5-OXAZOLIDINE-DIONE-2,4	42
1° Organisation de l'expérience.	42
2° Résultats	43
A. Croissance à l'obscurité	43
B. Croissance à la lumière	44
a) Croissance observée	44
b) Croissance mesurée	45
3° Discussion	49
Chapitre V: INHIBITION DE LA FIXATION DE CO₂ PAR DES PLANTES ENTIÈRES.	50
1° Action de la parachlorophényl-3-éthyl-5-oxazolidine-dione-2,4.	50
2° Action de trois autres oxazolidine-diones	52
3° Mise en évidence d'une période de latence entre le traitement et la manifestation de l'inhibition.	54
4° Conclusion	55
Chapitre VI: ACTION « IN VITRO » DE LA PARACHLOROPHÉNYL-3-ÉTHYL-5-OXAZOLIDINE-DIONE-2,4 SUR LES CHLOROPLASTES ISOLÉS	56
1° Fixation de CO ₂	56
2° Transport d'électrons et photophosphorylation	60
3° Fixation de CO ₂ et photophosphorylation dans deux réactions parallèles.	62
4° Influence de la pCPEOD sur la nature des produits de fixation du CO ₂	63
5° Conclusion	64
Chapitre VII: ACTION DE LA PARACHLOROPHÉNYL-3-ÉTHYL-5-OXAZOLIDINE-DIONE-2,4 SUR LES PHOSPHORYLATIONS OXYDATIVES	66
1° Expérience réalisée avec des mitochondries de foie de rat	66
2° Expériences réalisées avec des mitochondries de concombres	67
3° Discussion	69
4° Conclusion	71
Chapitre VIII: ACTION DE QUATRE-PHÉNYL-3-ALKYL-5-OXAZOLIDINE-DIONE-2,4 SUR LE MÉTABOLISME GLUCIDIQUE DES PLANTES TRAITÉES	72
1° Comparaison des quatre-phényl-oxazolidine-diones-2,4	72
2° Action de la pCPEOD sur le métabolisme glucidique.	75
3° Discussion - Conclusion	77
Chapitre IX: INFLUENCE DE LA PARACHLORO-PHÉNYL-3-ÉTHYL-5-OXAZOLIDINE-DIONE-2,4 SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ DE PLANTES TRAITÉES ET DE CULTURES DE TISSUS DE TOPINAMBOURS.	79
1° Influence de la pCPEOD sur le métabolisme azoté des plantes.	80
A. Résultats de l'expérience IX A	80
a) Bilan azoté	80
b) Évolution des différentes formes d'azote entre le traitement et la récolte.	81
c) Composition de la fraction aminée soluble et des protéines	82

B. Résultats de l'expérience IX B.	83
a) Bilan azoté	83
b) Évolution des différentes formes d'azote.	84
c) Composition de la fraction aminée soluble	85
C. Résultats de l'expérience IX C.	86
a) Évolution des différentes formes d'azote.	87
b) Composition de la fraction aminée soluble	88
D. Discussion	88
a) Comparaison des résultats des trois expériences	88
b) Action du traitement sur la synthèse des Protéines.	90
c) Action du traitement sur les acides aminés libres	90
d) Action du traitement sur l'azote nitrique	90
E. Conclusion	92
2° Influence de la pCPEOD sur le métabolisme azoté de cultures de tissus de topinambours	92
A. Réalisation de l'expérience.	92
B. Résultats.	93
C. Discussion	93
3° Conclusions générales concernant l'action de la pCPEOD sur le métabolisme azoté	95
 Chapitre X : ACTION DE LA PARACHLOROPHÉNYL-3-ÉTHYL-5-OXAZOLIDINE-DIONE-2,4 SUR LES ACIDES ORGANIQUES DES PLANTES TRAITÉES	96
1° Résultats	96
2° Discussion	101
3° Conclusion	104
 Chapitre XI : DISCUSSION ET CONCLUSIONS.	106
1° Mode d'action de la parachlorophényl-3-éthyl-5-oxazolidine-dione-2,4.	106
a) Désaccouplement des photophosphorylations et inhibition de la fixation de CO ₂	106
b) Importance relative du désaccouplement des phosphorylations photosynthétiques et oxydatives	109
c) Conséquences sur le métabolisme général	110
d) Conclusion : mode d'action de la parachlorophényl-3-éthyl-5-oxazolidine dione-2,4	111
2° Mode d'action des phényl-3-alkyl-5-oxazolidine-dione	112
a) Interaction avec la photosynthèse.	112
b) Action mitoclasique	114
c) Phytotoxicité générale de la famille des phényl-oxazolidine-diones.	114
 BIBLIOGRAPHIE.	117

INTRODUCTION

Depuis une vingtaine d'années, l'emploi des herbicides en agriculture a pris une extension considérable. Deux causes sont à l'origine de cette évolution : la généralisation de la mécanisation agricole d'une part et les progrès de la recherche et de l'industrie chimique d'autre part. Des désherbants déjà connus antérieurement, comme les dérivés du 2.4.D. (*) ou les nitrophénols substitués par exemple, ont été utilisés sur des surfaces beaucoup plus importantes et un grand nombre de produits nouveaux sont apparus, qui ont permis de protéger efficacement de nouvelles cultures contre leurs adventices. C'est ainsi, pour ne citer que quelques exemples, que les triazines (**), le dalapon (***), le PCA (****) ont été appliqués avec succès pour la destruction des mauvaises herbes du maïs, du colza et de la betterave sucrière, sans dommage pour la plante cultivée.

Un certain nombre de problèmes de désherbage très importants, intéressant des surfaces considérables, ont ainsi été résolus. Il n'en reste pas moins qu'on ne dispose pas encore d'herbicide sélectif satisfaisant pour un grand nombre de plantes cultivées, ce qui laisse un champ très large aux synthèses de nouveaux produits. D'autre part il arrive que de nouvelles adventices apparaissent dans des cultures jusque-là désherbées de façon satisfaisante. En effet il est rare que des herbicides sélectifs soient actifs sur toutes les mauvaises herbes existantes : c'est ainsi que le 2.4.D. et les nitrophénol substitués sont sans action sur les graminées, le dalapon inefficace sur les dicotylédones, et la simazine sur le cynodon dactylon. L'emploi généralisé de ces désherbants favorise l'extension de ces adventices résistantes, dont l'envahissement peut causer une gêne considérable aux cultures. C'est ainsi que le Vulpin (*Alopecurus arvensis*) et la Follavoine (*Avena fatua*) qui étaient auparavant

(*) Acide dichloro-2.4 phénoxy acétique.

(**) Chloro-2, alkylamino-4-6, s-triazines.

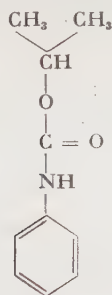
(***) Acide dichloro-2-2, propionique.

(****) Phényl-1, Amino-4, chloro-5, pyridazone-6.

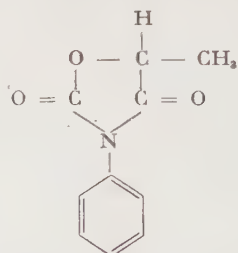
des adventices mineures sinon inconnues des champs de céréales sont devenues depuis la généralisation des traitements à base de 2.4.D. et de colorants nitrés, les principales mauvaises herbes de ces cultures, posant ainsi un nouveau problème de désherbage pour lequel aucune solution définitive n'a encore été proposée (59).

La nécessité de synthétiser de nouveaux composés susceptibles de résoudre les problèmes en suspens et ceux posés par les infestations nouvelles reste donc permanente, malgré le nombre déjà impressionnant de produits expérimentés et utilisés pratiquement.

Dans cet esprit G. MOREL (68) a essayé de réaliser la synthèse de composés nouveaux en modifiant légèrement la molécule des phényl carbamate d'isopropyl, herbicides qui paraissaient très prometteurs en raison de leur action sur les graminées (Templeman-Sexton 94). Le remplacement d'un CH_3 du radical isopropyle par un groupement COOH conduit à une cyclisation du composé sous forme d'oxazolidine-dione (MOREL, 68).



Phényl carbamate d'isopropyle



Phényl-3 méthyl-5 oxazolidine
dione-2.4

Une cinquantaine de phényl-oxazolidine-dione-2.4. ont été synthétisées, tant par G. MOREL au Centre National de la Recherche Agronomique, que par R. LEVY au Centre d'Études du Bouchet. Un certain nombre d'entre elles ont manifesté des propriétés herbicides intéressantes, et R. LONGCHAMP a expérimenté sur le terrain leur application au désherbage sélectif de certaines grandes cultures. Nous avons alors entrepris d'étudier le mode d'action physiologique des herbicides de cette famille.

1^o HISTORIQUE DES ÉTUDES SUR LE MODE D'ACTION DES PRINCIPAUX HERBICIDES

L'étude des propriétés physiologiques des herbicides a déjà donné lieu à une littérature abondante, même en mettant à part celle relative au 2.4.D, à elle seule très considérable. La période précédant 1940 avait vu l'apparition des premiers herbicides organiques actifs à faible dose — de l'ordre de 5 à 10 kg /ha — alors que les herbicides minéraux du type chlorate exigent des doses 10 à 40 fois plus élevées. Au cours des deux dernières décades, des familles très nombreuses d'herbicides sont apparues : phényl-carbamates, anilides, phényl-urées, acides benzoïques et benzonitriles, thiol et dithiocarbamates, hydrazide maléïque, aminotriazole, triazines et tout récemment les phényl-pyridazones et les sels de dipyridylum. Chacune de ces familles a fourni des herbicides très intéressants dont certains sont remarquables par leur efficacité ou pour leur sélectivité vis-à-vis de certaines plantes cultivées.

L'étude de leur mode d'action présente un grand intérêt pour la physiologie végétale. Elle comporte deux aspects complémentaires : d'une part la détermination des processus biochimiques perturbés chez les espèces sensibles, et d'autre part la mise en évidence des causes de la résistance pour les autres espèces.

A. — *Études du mode d'action des herbicides sur les espèces sensibles :*

Cette étude a été entreprise par de nombreux auteurs pour quelques grandes familles d'herbicides. Il a ainsi été établi que les phényl-urée du type CMU ou DCMU (N(4 chloro-phényl) [NN' diméthyl-urée) ou les triazines du type simazine (2 chloro-4.6 bis-éthylamino-s-triazine) inhibent *in vitro* la réaction de HILL, à des seuils de concentration extrêmement bas (COOKE (32), BISHOP (15), EXER (40), MORELAND et HILL (69)). Cette propriété est partagée quoique généralement pour des seuils d'inhibition plus élevés par les phényl-carbamates et les anilides (MORELAND et HILL (70, 71, 72, 73)).

D'une façon générale, il existe au moins à l'intérieur de chaque famille une corrélation satisfaisante entre l'activité herbicide observée

en serre sur une espèce déterminée et l'inhibition de la réaction de HILL mesurée *in vitro*.

Comme d'autre part ces composés sont sans action sur la germination à l'obscurité et que la photosynthèse est *in vitro* le processus le plus sensible à leur action, il n'est pas douteux que leurs propriétés herbicides résultent de l'inhibition de la réaction de Hill et plus précisément, comme l'a montré BISCHOP (15) d'une intervention sur le trajet conduisant à la libération de l'oxygène.

Cette intervention sur le transport d'électrons dans les chloroplastes définit un premier type de mode d'action qui est donc partagé par un grand nombre d'herbicides.

On connaît par ailleurs un deuxième type de mode d'action, le désaccouplement des phosphorylations oxydatives, illustré par les dinitrophénols substitués (LOOMIS et LIPMANN, 60).

Un autre type de propriétés rendant compte de l'action herbicide est l'action mitoclasique, commune à un certain nombre de phényl-carbamates (IVENS-BLACKMANN (53)) et à l'hydrazide maléique (NAYLOR et DAVIS (79)).

Un dernier type de mode d'action extrêmement original par rapport aux autres herbicides est celui de l'aminotriazole (*) bien qu'il ne reste encore qu'incomplètement déterminé. RACUSEN (86) a montré que l'aminotriazole subit une rapide métabolisation dans la plante; cependant les produits ainsi obtenus sont relativement peu toxiques. En outre MASSINI (64) a montré que le composé 3-hydroxy-1.2.4-triazole, qui n'a aucune propriété herbicide, est métabolisé dans les plantes de la même façon que l'aminotriazole : il n'est donc pas possible que l'action toxique soit liée à la formation de ces métabolites. Dans une récente revue sur le mode d'action des herbicides HILTON, JANSEN et HULL (50) citent 3 possibilités : une intervention de l'aminotriazole dans le métabolisme des porphyrines (inhibition de la synthèse des porphyrines, inhibition de l'activité de la catalase), la formation de chélates perturbant le fonctionnement d'enzymes comportant un ion métallique, et le métabolisme des purines. On en reste cependant dans tous les cas à de simples hypothèses concernant le mode d'action de cet herbicide.

(*) Amino-3 triazole-1.2.4.

B. — *Études de la résistance :*

L'étude de la pénétration et de la translocation des désherbants a été entreprise par de nombreux auteurs et principalement CRAFTS (33) et ses collaborateurs. Le problème des transformations de la molécule dans les tissus de la plante, qui lui est étroitement lié a été également étudié pour un grand nombre d'herbicides. Ce dernier problème présente un intérêt particulier : il ressort en effet nettement que les quelques cas de sélectivité physiologique vraie, comme celui de la résistance du maïs vis-à-vis des triazines par exemple, sont liés à une transformation du composé, *in situ*, sous une forme inactive. On a pu en effet montrer que les chloroplastes isolés de maïs sont sensibles *in vitro* à l'action de la Simazine, qui inhibe la réaction de Hill aux mêmes seuils que pour les chloroplastes extraits des plantes sensibles (MORELAND et HILL (69), EXER (40)). Le mécanisme responsable de la sélectivité se situe donc ailleurs que dans les chloroplastes. Il a été également montré que les racines de certaines espèces sont susceptibles de réaliser le remplacement de l'atome de chlore en position 2 par un groupement hydroxyle et que le dérivé ainsi obtenu est sans activité. Il existe une autre forme de dégradation de la molécule de Simazine par ouverture du noyau triazine et finalement dégagement de CO_2 (HILTON, JANSEN, HULL (50)).

2° LIMITES DE NOTRE ÉTUDE

On voit qu'il s'agit là d'un domaine très différent de celui qui se borne à déterminer les causes de la phytotoxicité. Nous ne l'avons pas abordé dans nos recherches, nous limitant au mode d'action, sur les espèces sensibles, des phényl-3-alkyl-5-oxazolidine-dione-2.4. Nous n'avons pas non plus abordé l'étude de la pénétration et de la translocation de ces herbicides; d'une part nous ne disposions pas de molécules marquées et d'autre part l'observation des symptômes montre nettement que les deux voies de pénétration : racines et feuilles, sont également utilisables par ces herbicides.

Dans cet esprit, nous avons recherché si les grands types de

mode d'action que nous avons cités (inhibition de la réaction de Hill, action mitoclasique) étaient partagés également par les herbicides de cette famille et dans quelle mesure ces actions pouvaient rendre compte de l'effet herbicide. Nous avons également étudié quelles étaient les conséquences sur le métabolisme général du traitement herbicide.

3^o PLAN DU MÉMOIRE

Nous exposerons le résultat de ces recherches en abordant successivement :

- La détermination des composés les plus actifs de la famille.
- L'examen des propriétés mitoclasiques des dérivés ainsi retenus.
- Pour ceux d'entre eux qui n'ont pas de propriétés mitoinhibitrices, l'étude des effets du traitement sur la croissance de plantules, à l'obscurité et à la lumière.
- La mesure de la fixation photosynthétique de CO_2 par des plantes entières traitées; l'inhibition de la croissance à la lumière suggère en effet une intervention de ces composés au niveau des processus photosynthétiques.
- La confirmation des résultats précédents par l'étude de l'inhibition *in vitro* de la fixation de CO_2 par des chloroplastes isolés et la recherche des réactions photosynthétiques concourant à la fixation de CO_2 qui sont inhibées.
- Enfin la recherche des conséquences qu'entraîne sur le métabolisme des glucides, de l'azote et des acides carboxyliques, le traitement sur des plants de tomates et de sojas.

Chapitre I

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1^o MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les plantes que nous avons utilisées pour nos expériences étaient cultivées en serre, sur un mélange de sable et de gravier, en pots, et arrosées par la solution nutritive minérale d'Hoagland. Des rampes de tubes fluorescents (types lumière du jour de luxe et blanc super en alternance) à allumage et extinction automatique (12 h d'éclairage par jour) assuraient un éclairage de 7 000 lux environ au niveau des plantes. Sauf indication contraire, ces conditions sont celles qui ont été utilisées pour toutes les expériences.

2^o TRAITEMENTS HERBICIDES

Les composés destinés à être pulvérisés sur les plantes sont dissous à chaud dans le Tween 85 (*). Cette solution est ensuite dispersée dans l'eau et l'émulsion ainsi obtenue pulvérisée sous pression sur les plantes. Cette formulation ne permet cependant pas d'obtenir des émulsions stables très concentrées en matière active (de l'ordre de 10^{-2} M), aussi les pulvérisations sont-elles réalisées avec des volumes relativement élevés (5 ml par pot, ce qui correspond à un traitement par hectare de 6 400 litres environ, alors que les traitements normaux sont effectués à raison de 1 000 l/ha environ).

(*) Monooléate de Polyoxyéthylène sorbitol.

Dans certains cas nous avons utilisé la formulation suivante : dissolution du composé dans la diméthylformamide (*) (DMFA), dans laquelle les phényl-oxazolidine-dione sont très solubles, puis addition de Tween 85, à raison de 5 à 10 volumes par volume de DMFA et dispersion dans l'eau. On peut ainsi obtenir des émulsions stables pour des concentrations en matière active assez élevées (10^{-2} M). Dans ces conditions la concentration en DMFA ne dépasse jamais 0,4 p. 100 (v/v). Épandue à raison de 1 000 litres par hectare, une telle émulsion, réalisée avec les seuls agents solvants et dispersifs, n'est pas phytotoxique dans les conditions de nos essais, sauf sur les graines en germination.

Le traitement des graines en germination a été effectué avec une émulsion du même type que celles utilisées pour les plantes, soit par contact prolongé, soit par pulvérisation.

3° OBSERVATIONS HISTOLOGIQUES

Elles ont été effectuées sur des méristèmes de racines d'orge (*Hordeum vulgare*) après germination à l'étuve. On a utilisé les techniques classiques pour l'observation des divisions des noyaux (LANGERON (57)) (fixation, inclusion dans la paraffine, coupe, coloration au Feulgen; le fixateur utilisé était celui de Nawaschine : acide chromique 60 ml, formol neutre 24 ml, acide acétique 6 ml).

(*) Nous utilisons les abréviations suivantes :

DMFA. : diméthylformamide.

C1S : chloroplastes éclatés d'épinards.

E.A.C. : extrait aqueux de chloroplastes.

Pm : phosphore minéral.

ADP et ATP : adénosine di- et tri- phosphate.

NADP et NADPH₂ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme oxydée et réduite).

APG : acide-3-phosphoglycérique.

ADPG : acide-1.3-diphosphoglycérique.

RuDP : ribulose-1.5-diphosphate.

Ru5P : ribulose-5-phosphate.

DNP : 2.4-dinitrophénol.

FMN : flavine mononucléotide.

PMS : méthyl sulfate de N méthyl phénazonium.

SMP : sucres monophosphate.

SDP : sucres diphosphate.

DAP : dihydroxyacétone phosphate.

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique.

4° FIXATION DE $^{14}\text{CO}_2$ PAR LES PLANTES ENTIÈRES

Nous avons utilisé une chambre de dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ analogue dans son principe à celles décrites pour l'étude de la fixation photosynthétique par des feuilles excisées; nous avons adapté la technique utilisée par F. M. ASHTON, URIBE et ZWEIG (9) pour l'étude de l'inhibition de la fixation de CO_2 par le CMU; ces auteurs avaient travaillé avec des feuilles excisées de plantes préalablement traitées avec cet herbicide. Nous avons pour notre part utilisé des plantes entières, en pot. Les plantes âgées de 10 à 20 jours, préalablement traitées ou non avec les herbicides dont on expérimente les propriétés inhibitrices, sont placées dans une enceinte de plexiglas de 300 litres de capacité environ. Cette enceinte est disposée sous une rampe d'éclairage. Les raccordements sont scellés par un joint mastic assurant une parfaite étanchéité aux gaz. On dégage dans cette enceinte environ 500 μc de $^{14}\text{CO}_2$ par addition d'acide lactique à 10 p. 100 à 10 milligrammes environ de $^{14}\text{CO}_3 \text{ Ba}$ (10 mc/mM). Après une heure de contact l'air de la chambre est aspiré par une pompe, le $^{14}\text{CO}_2$ non fixé par les plantes est absorbé par barbotage dans trois fioles consécutives de potasse concentrée. On réalise un balayage d'air correspondant à trois fois le volume de l'enceinte avant l'ouverture.

Les parties aériennes des plantes coupées au niveau du collet sont ensuite fixées dans l'éthanol à 80 p. 100 bouillant, puis broyées au mixer avec addition d'eau de façon à amener le titre de l'alcool à 50 p. 100. L'extrait ainsi obtenu est filtré et le filtrat amené à volume connu (200 ml). Un prélèvement de 1 ml est desséché sur coupelle et sa radioactivité est mesurée dans un compteur Geiger Muller à fenêtre mince de mica.

5° ACTION « IN VITRO » SUR DES CHLOROPLASTES ISOLÉS

a) *Préparation des chloroplastes*

Les préparations des chloroplastes éclatés d'épinards (CIS) et d'extraits aqueux de chloroplastes (EAC) ont été effectuées, à partir de plantes achetées au marché local, conformément aux schémas

expérimentaux d'ARNON et de ses collaborateurs (1, 4, 5, 107, 108). Les principales étapes en sont résumées ci-dessous :

- préparation des chloroplastes éclatés (CIS);
 - broyage des feuilles avec NaCl 0,35 M + tampon Tris-HCl 0,02 M pH 8,0 + ascorbate de sodium 0,01 M,
 - filtration sur étamine,
 - centrifugation différentielle entre 200 et 1 000 g,
 - lavage des chloroplastes entiers avec ascorbate 0,01 M + NaCl 0,35 M, puis éclatement dans ce même milieu dilué 10 fois,
 - toutes les opérations sont conduites à 0-2 °C;
- préparation des extraits aqueux de chloroplastes (EAC),
 - une partie aliquote des chloroplastes éclatés (CIS) ainsi préparés est centrifugée pendant 10 minutes à 20 000 g à 0 °C. Le surnageant constitue l'EAC.

Nous avons également utilisé dans quelques expériences des chloroplastes de choux chinois (*Brassica chinensis*, var Wong Bok), suivant un protocole d'extraction mis au point par A. GOFFEAU (44). Les feuilles sont broyées dans un milieu composé de NaCl 3 p. 100, Tris-HCl pH 8,0-0,05 M et ascorbate 0,01 M. Les chloroplastes sont isolés par centrifugation différentielle entre 100 et 1 000 g, puis repris par le même milieu que celui qui a servi au broyage, dilué 10 fois. A. GOFFEAU a montré que dans ces conditions les chloroplastes de choux chinois sont susceptibles de réduire à la lumière le ferricyanure ou la NADP en dégageant de l'oxygène et de transformer ADP en ATP. La phosphorylation cyclique vraie avec PMS peut également se dérouler avec un rendement égal à celui observé avec des chloroplastes d'épinards.

b) *Déroulement des réactions lumineuses*

Les cofacteurs utilisés pour les différents types de réaction sont ceux indiqués dans les mêmes publications. Nous indiquerons la composition du milieu réactionnel pour chaque expérience.

L'inhibiteur, très insoluble dans l'eau, est véhiculé avec du méthanol, à raison de 0,2 ml pour 3 millilitres de mélange réactionnel. Sauf cas contraire, il est placé dans le bras latéral et versé dans le corps principal de la fiole au début de la réaction. Les fioles témoins contiennent le même volume de méthanol (sans inhibiteur) que les autres.

L'addition d'alcool permet seulement de véhiculer commodément l'inhibiteur. Elle n'assure malheureusement pas son maintien en solution en présence d'eau. Le produit précipite partiellement au moment du transfert de sa solution méthanolique dans le milieu réactionnel. Il n'est pas possible de pallier cette difficulté, de sorte que nous ignorons en fait la concentration réelle d'inhibiteur en solution et le rôle joué par la fraction précipitée. Il s'est avéré en outre qu'il était nécessaire de véhiculer l'inhibiteur dans un volume minimum de méthanol (0,2 ml pour 3 ml de mélange réactionnel).

En dessous de ce minimum on n'observe pas d'inhibition : la quantité d'inhibiteur restant en solution est probablement trop faible. Inversement au-dessus de 0,2 ml le méthanol a un effet désaccouplant trop important.

Toutes ces expériences ont été effectuées dans un appareil de WARBURG équipé d'une rampe d'éclairage fournissant 75 000 lux au niveau des fioles. La température du bain était fixée à 15° pour les réactions de HILL et les phosphorylations cycliques, et à 20° pour les fixations de CO₂. Dans tous les cas les expériences ont été réalisées sous atmosphère d'azote.

c) Mesures des réactions photochimiques

Le dégagement d'oxygène est suivi manométriquement. Les autres mesures sont effectuées de la façon suivante :

— les réactions sont arrêtées par addition de 0,2 ml d'acide trichloracétique à 10 p. 100. Le contenu des fioles est ensuite centrifugé. Les mesures réalisées sont les suivantes :

— pour la fixation de CO₂ : mesure de la radioactivité d'un prélèvement aliquot, étalé en couche mince et séché,

— pour la réduction de NADP : mesure de la densité optique à 340 m μ ,

— pour l'estérification du phosphore minéral : le phosphore inorganique restant dans le surnageant est éliminé par formation du phosphate ammoniaco-magnésien (4) et filtration. La quantité de phosphore estérifié est mesurée par la radio-activité du filtrat.

d) *Chromatographie des extraits après fixation de $^{14}\text{CO}_2$*

Le contenu des fioles est centrifugé. On prélève sur le surnageant des volumes correspondant à une radioactivité de 5 000 cpm environ. On chromatographie sur papier Whatman 41 avec développement dans deux dimensions : 1^{re} phase : phénol (80), eau (20); 2^e phase : butanol (52), acide acétique (14), eau (34) (61). Les taches sont repérées par autoradiographie et leur radioactivité mesurée directement sur le papier.

6° ACTION « IN VITRO » SUR DES MITOCHONDRIES DE FOIE DE RAT ET SUR DES MITOCHONDRIES D'HYPOCOTYLES ÉTIOLÉS DE CONCOMBRES

a) *Expérience sur foie de rat*

La méthode utilisée, très classique est décrite par ANDREJEW, DUCET, LOVW et ROSENBERG (2). L'homogénat, obtenu par centrifugation différentielle entre 1 000 et 10 000 g est mis en suspension dans du saccharose 0,25 M (SCHNEIDER et HOGEBOM (88)) et placé en contact avec le milieu réactionnel suivant, très légèrement modifié par rapport au milieu décrit :

	Tampon Phosphate pH 7,4	30	μM
	Tampon TRIS HCl pH 7,4	30	μM
	ATP	7,5	μM
	FNa	50	μM
	Saccharose	50	μM
	Succinate	100	μM
	MgCl ₂	40	μM
Bras latéral {	Hexokinase		
	Glucose	50	μM
	Inhibiteur + éthanol	1	μM dans 0,01 ml

L'expérience est réalisée à 28° pendant 20 minutes et la respiration mesurée manométriquement; la réaction est arrêtée avec de l'acide trichloracétique 20 p. 100. L'estérification du Phosphore minéral est mesurée par le dosage du Phosphore inorganique en fin de réaction, par différence avec celui restant dans les fioles qui n'ont pas reçu de succinate.

Le dosage du Phosphore se fait suivant la méthode décrite par J. L. DELSAL et H. MANHOURI (36) (réduction du complexe phosphomolybdique par le mélange rhodol-sulfite de sodium, à pH 4,0).

L'insolubilité dans l'eau de l'inhibiteur étudié oblige comme pour les chloroplastes à le véhiculer en solution alcoolique. Cependant l'éthanol à concentration égale à celle utilisée pour le méthanol dans les suspensions de chloroplastes (6 %) a une action dépressive sur la respiration et sur les phosphorylations oxydatives (ROSENBERG communication personnelle). Dans ces conditions nous avons été obligés de nous limiter à une concentration d'inhibiteur compatible avec un volume d'alcool sans effet dépressif propre (0,01 ml d'éthanol pour 2,2 ml de mélange réactionnel, permettant de dissoudre 1 μ M d'inhibiteur). Comme dans le cas des suspensions de chloroplastes éclatés, les fioles témoins reçoivent la même quantité d'éthanol que celle qui sert à véhiculer l'inhibiteur dans les autres fioles.

b) *Expériences sur hypocotyles étiolés de concombres*

Limités par la concentration en éthanol, pour l'étude de l'action *in vitro*, nous avons préféré observer le comportement de mitochondries extraites de plantes préalablement traitées avec l'inhibiteur. SWITZER (92) puis KEY, HANSON et BILLS (55) ont étudié l'action du 2-4 D, préalablement pulvérisé sur des plantules de soja, sur le comportement des mitochondries isolées ultérieurement des hypocotyles.

Cependant les expériences que nous avons réalisées avec des mitochondries d'hypocotyles étiolés de soja nous ont donné des rendements médiocres; aussi nous avons préféré utiliser des germinations de concombres (*Cucumis sativus*), matériel employé par STENLID et SADDIK (90) pour étudier l'action désaccouplante *in vitro*

de différents régulateurs de croissance. Ce matériel donne des germinations parfaitement homogènes, exemptes de toute infestation de moisissures. Les mitochondries extraites des hypocotyles étiolés ont des rendements respiratoires satisfaisants et une bonne activité phosphorylative. Nous avons donc suivi dans les grandes lignes le mode opératoire indiqué par ces auteurs, en l'adaptant à notre cas en traitant au préalable des plantules et en modifiant quelques détails opératoires (addition d'EDTA dans le milieu de broyage, méthode de dosage du Phosphore minéral). Les opérations ont donc été les suivantes :

Germinations. — Les graines sont mises à germer sans trempage préalable à l'étuve, à 28° et à l'obscurité. Les plantules sont mises en contact après 48 à 72 heures avec une suspension de l'herbicide étudié, préparée au Tween 85 seul (cf II § 2). (Les préparations effectuées au mélange DMFA + Tween ne sont pas utilisables pour ces expériences, la DMFA ayant une action inhibitrice importante sur les plantules en germination.) Les plantules restent en contact avec cette solution 24, 48 ou 72 heures suivant le cas. Les lots témoins subissent un traitement identique avec une émulsion à base de Tween aux mêmes concentrations que pour les autres traitements.

Extraction des mitochondries. — On récolte et on découpe en fragments de quelques millimètres les hypocotyles; puis on les broie au mortier (le broyage au mixer s'est avéré avoir une action dépressive sur les phosphorylations) en présence d'une solution contenant : tampon Phosphate 0,1 M; saccharose 0,4 M; EDTA 0,01 M. Le pH de cette solution est de 7,1 (l'addition d'EDTA au milieu de broyage permet d'obtenir des P/O plus élevés que ceux cités par les auteurs). Après filtration du broyat à travers une étamine, on recueille le culot de centrifugation entre 1 500 et 10 000 g. Ce culot est lavé une fois par une solution de tampon Phosphate 0,035 M pH 7,4 + saccharose 0,3 M. Après une nouvelle centrifugation, le culot est repris par 3 millilitres de cette même solution et homogénéisé. Depuis le broyage jusqu'à la mise en place des fioles de Warburg dans le bain-marie, les opérations sont conduites à 0-2°.

Milieu réactionnel. — Les suspensions de mitochondries sont mises en contact avec le milieu réactionnel suivant (μM /fiole de 3 ml) :

	Saccharose	900 μM
	Succinate	20 μM
	NaF	20 μM
	MgCl ₂	2 μM
	ATP	2 μM
Bras latéral {	Hexokinase	200 μM
	Glucose	

Dans chaque fiole le saccharose est réparti entre le compartiment central et le bras latéral de façon à éviter les chocs osmotiques au moment de l'addition du mélange hexokinase + glucose.

Le phosphore minéral est apporté avec l'homogénat et représente 35 μM par fiole. Les quantités de mitochondries représentant 0,10 à 0,30 mg d'N environ.

Mesures. — L'absorption d'oxygène est suivie manométriquement à 28° pendant 20 minutes. L'estérification du phosphate minéral par la différence de teneur dans les fioles avant et après la réaction. On fait un prélèvement aliquot de 0,5 ml au début et à la fin : ces prélèvements sont versés dans 4,5 ml d'acide trichloracétique froid à 5,5 p. 100 et centrifugés. Le dosage du phosphore minéral restant dans le surnageant est effectué comme indiqué plus haut (DELSAL et MANHOURI (36)).

7° ANALYSE DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS LIBRES ET LIÉS, ACIDES CARBOXYLIQUES, SUCRES SOLUBLES ET AMIDON DES PLANTES TRAITÉES

a) Dosage de l'amidon

Nous avons utilisé la méthode décrite par HASSID et ABRAHAM (49) adaptée de PUCHER (84) en opérant sur des matières sèches pulvérisées. Les sucres solubles ayant été éliminés par l'action de l'éthanol 80 p. 100 chaud, l'amidon est dissous par l'acide perchlorique, puis précipité par le mélange I + IK. Le complexe obtenu est décomposé par la soude alcoolique, puis hydrolysé par

HCl. Le glucose libéré est dosé soit par la méthode NELSON (80), soit par le réactif à l'anthrone (MORRIS (74), DIMLER et coll. (38)).

b) Dosage de l'azote total et le l'azote nitrique

Comme pour les dosages d'amidon, on opère sur des tissus préalablement séchés à l'étuve à 85° pendant 24 heures puis broyés au broyeur à billes DANGOUMEAU.

Le dosage de l'azote total est fait suivant la méthode KJELDAHL, en utilisant comme catalyseur un mélange de 15 p. 100 de sulfate de cuivre, 80 p. 100 de sulfate de potasse et 5 p. 100 de sélénium. Nous avons vérifié que la réduction préalable des nitrates par un sel ferreux donnait les mêmes résultats. La réduction est donc complète avec SO_4H_2 et le catalyseur.

Le dosage de l'azote nitrique est fait suivant MORRIS et GONZALESMAS (75). Les nitrates sont extraits par ébullition à reflux, les pigments colorés sont détruits par action de NaOH 0,5 N et d'eau oxygénée à 80 p. 100 à chaud. La liqueur est ensuite évaporée au bain de sable, puis à l'étuve, à sec; on ajoute un mélange d'acide sulfurique et de sulfate de fer : le complexe formé est dosé colorimétriquement à 550 m μ .

Nous avons également utilisé la méthode KJELDAHL pour mesurer l'azote soluble total et l'azote insoluble. La matière sèche est traitée dans un pot de centrifugeuse par l'éthanol 50 p. 100 chaud; on sépare l'insoluble par centrifugation. Le culot est repris par deux fois avec l'éthanol 50 p. 100 chaud. Les surnageants sont réunis et amenés à volume connu. Les dosages sont effectués sur les fractions solubles et insoluble ainsi obtenues.

Nous avons mesuré l'N ammoniacal soluble sur les fractions solubles ainsi obtenues, en distillant sous vide, à 50 °C, dans un appareil de Parnas Wagner (modification de la technique de YOVANOVITCH (111)).

c) *Extraction et dosage des acides aminés, des acides carboxyliques non volatils et des sucres solubles*

Nous suivons pour l'extraction la méthode décrite par BOVE et RAVEUX (20); fixation des tissus dans l'azote liquide, broyage à la même température et mise en contact immédiat avec une résine échangeuse de cations (Permutite 50, forme H^+), puis avec une résine échangeuse d'anions (Dowex 2, forme carbonate); cette fixation est suivie d'une centrifugation 10 000 g à 0°. Le surnageant repasse successivement sur Permutite 50 et Dowex 2. L'éluat, constitué par la fraction neutre contient les sucres solubles. Les acides aminés libres retenus sur Permutite sont élués par l'ammoniaque N et les acides carboxyliques sont élués de la Dowex 2 par le carbonate d'ammonium M.

Le culot de centrifugation est hydrolysé par chauffage à reflux pendant 12 heures par un fort excès d'HCl 6 N, puis filtré. L'excès d'HCl est chassé par concentration sous vide dans un évaporateur rotatif à 35 °C puis l'extrait est dessalé sur Permutite 50, les acides aminés étant élués comme précédemment par NH_4OH N.

Les deux fractions acides aminés (libres et constitutifs des protéines) sont concentrées à sec sous vide et reprises par le minimum d'eau. Elles sont alors chromatographiées sur papier et dosées conformément à la méthode mise au point par MENORET (65) qui est une adaptation de la technique de THOMSON, ZACHARIUS et STEWARD (95-96) et de celle de LEVY et CHUNG (58). L'arginine et la proline sont dosées respectivement par la méthode de MAC PHERSON (62) et la méthode de CHINARD (26). L'asparagine n'est pas dosée.

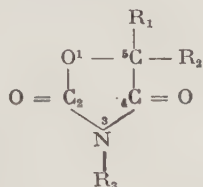
La fraction acide carboxylique est également concentrée à sec sous vide, en laissant les acides sous forme de sels d'ammonium de façon à éviter les pertes (20) puis reprise par un volume connu. L'acidité totale est titrée sur une partie aliquote et la fraction chromatographiée sur colonne de silice conformément à la technique de BOVE et RAVEUX (21). La confirmation de la nature des pics obtenus est faite par chromatographie sur papier suivant CHEFTEL et MACHEBEUF (24-25).

La fraction neutre, qui contient les sucres solubles est chromatographiée sur papier, suivant la technique de COLOMBO et collaborateurs (30), en développement unidimensionnel. Les taches d'extrait à chromatographier sont disposées par couple côte à côte, de façon à avoir une bande pour le repérage des taches et une autre pour l'élution et le dosage. Avec le système de solvants recommandé par ces auteurs (pyridine : I; eau : 1,15; acétate d'éthyle : 3,6) nous développons les chromatogrammes à 25 °C en deux fois : 20 heures puis 4 heures avec séchage du chromatogramme entre les deux opérations. Les glucides sont révélés sur une bande par couple, en deux fois : première révélation au phtalate d'aniline (81) pour les aldoses, suivie d'une révélation à l'urée chlorhydrique pour les cétooses (35). Les taches ainsi repérées permettent de déterminer l'emplacement sur les bandes correspondantes. Les surfaces ainsi délimitées sont découpées et éluées par trempage dans 2 millilitres d'eau distillée, puis filtration sur verre fritté; avec les eaux de rinçage, le volume du filtrat est ajusté à 5 millilitres. Le dosage est effectué en double sur deux prélèvements de 2 millilitres, en utilisant le réactif à l'anthrone (MORRIS (74), DIMLER et coll. (38)).

Chapitre II

PHYTOTOXICITÉ DES PHÉNYL-3-ALKYL-5-OXAZOLIDINE-DIONES-2.4

La famille des phényl-3-oxazolidine-diones 2.4 dont nous avons expérimenté les propriétés herbicides était représentée par une cinquantaine de composés, correspondant à des substitutions variées sur le squelette ci-dessous :



— R_3 : est constitué d'un noyau phényl, substitué ou non par un ou plusieurs atomes de chlore;

— R_1 : H et éventuellement méthyl (il est alors associé à R_2 : méthyl ou R_2 : éthyl);

— R_2 : soit H,

soit alkyl de C_1 à C_6 , éventuellement chlorosubstitué,
soit alkène (propenyl),

soit phényl éventuellement chlorosubstitué;

— R_1 et R_2 : peuvent être associés pour former un cycle (cyclopenta-méthyl-cyclotétra-méthyl).

Nous disposons également de quelques phényl-thiazolidine-diones (l'oxygène 1 est remplacé par un soufre) avec les substitutions suivantes :



Nous avons tout d'abord mesuré la phytotoxicité de tous ces composés, de façon à éliminer ceux qui ne présentent aucune propriété herbicide ni inhibitrice de la croissance.

1° MESURE DE LA PHYTOTOXICITÉ

Le critère de sélection a été l'inhibition de la croissance mesurée 8 à 10 jours après le traitement. Elle devait être d'au moins 75 p. 100 à 15 kilogrammes par hectare. Les composés étaient appliqués à 5, 15 et 25 kilogrammes par hectare, en pulvérisation sur les parties aériennes des plantes d'une part, ou directement sur le sable. La mesure a porté sur 9 espèces différentes (*Sinapis alba*, *Raphanus sativus*, *Pisum sativum*, *Helianthus annuus*, *Lycopersicum esculentum*, *Alopecurus agrestis*, *Avena fatua*, *Avena sativa* et *Triticum vulgare*).

Cet essai préliminaire nous a conduit à ne garder comme présentant une efficacité intéressante que 9 composés, correspondant aux substitutions suivantes :

- $R_1 = H$;
- $R_2 =$ méthyl, éthyl, propyl (*n* ou *iso*);
- $R_3 =$ phényl, parachlorophényle, métachlorophényle;

Ce résultat nous a montré, d'une part que les thiazolidine diones n'ont qu'une activité très faible, même celles dont les homologues oxo sont actives, et d'autre part que pour les oxazolidine diones, l'allongement de la chaîne alkyl au-delà de C_3 amène une baisse importante d'activité; la substitution $R_1 = R_2 = H$ est également sans grand intérêt; enfin pour une même substitution en R_1 , R_2 ($H.CH_3$) la substitution du noyau phényle par 2 chlore ou plus entraîne une baisse d'efficacité.

Les 9 composés présentant une activité intéressante sont les suivants :

- PMOD Phényle-3-méthyle-5-oxazolidine-dione-2.4;
- mCPMOD méta chlore phényle 3 méthyle 5 oxazolidine dione 2.4.
- pCPMOD para chlore phényle 3 méthyle 5 oxazolidine dione 2.4.
- pCPEOD para chlore phényle 3 éthyle 5 oxazolidine dione 2.4.
- mCPEOD méta chlore phényle 3 éthyle 5 oxazolidine dione 2.4.
- mCPnPOD méta chlore phényle 3 n propyle 5 oxazolidine dione 2.4.
- pCPnPOD para chlore phényle 3 n propyle 5 oxazolidine dione 2.4.
- mCPiPOD méta chlore phényle 3 iso propyle 5 oxazolidine dione 2.4.
- pCPiPOD para chlore phényle 3 iso propyle 5 oxazolidine dione 2.4.

Pour déterminer ensuite de façon plus précise les seuils d'activité de ces 9 composés, nous avons comparé l'inhibition de la croissance en poids frais et sec de *Pisum sativum* et de *Glycine max.* à des

doses croissantes en raison géométrique. Dans ces conditions la transformation en « probits » des valeurs trouvées pour l'inhibition de la croissance, en pourcent du témoin, permet théoriquement d'obtenir une régression linéaire entre le probit de l'inhibition et le logarithme de la dose appliquée (BLACKMAN (16), SAMPFORD (87). En effet l'inhibition de la croissance se présente le plus souvent, de même que les courbes de pourcentage de mortalité, comme une sigmoïde symétrique en fonction du logarithme de la dose appliquée. En calculant les valeurs de la fonction sigmoïde symétrique pour chaque valeur de l'inhibition mesurée en pourcent du témoin (transformation « Probit ») on obtient une relation linéaire entre les valeurs et le logarithme de la dose appliquée. La représentation graphique ainsi obtenue permet de comparer aisément des composés différents.

Les essais que nous avons réalisés pour comparer de façon assez précise la phytotoxicité des 9 composés retenus étaient donc organisés comme suit : les plantes, semées à raison de 4 par pot, ont été traitées en pulvérisation et récoltées 2 jours et demi plus tard dans le cas de Pois et 7 jours plus tard dans le cas de Soja. Cinq répétitions de chaque traitement étaient prévues. Le court délai entre le traitement et la récolte était destiné à mettre en évidence les composés les plus actifs. Pour quelques produits, il n'a pas été possible d'appliquer la dose de 24 kilogrammes par hectare par faute de pouvoir réaliser une émulsion assez stable aussi concentrée.

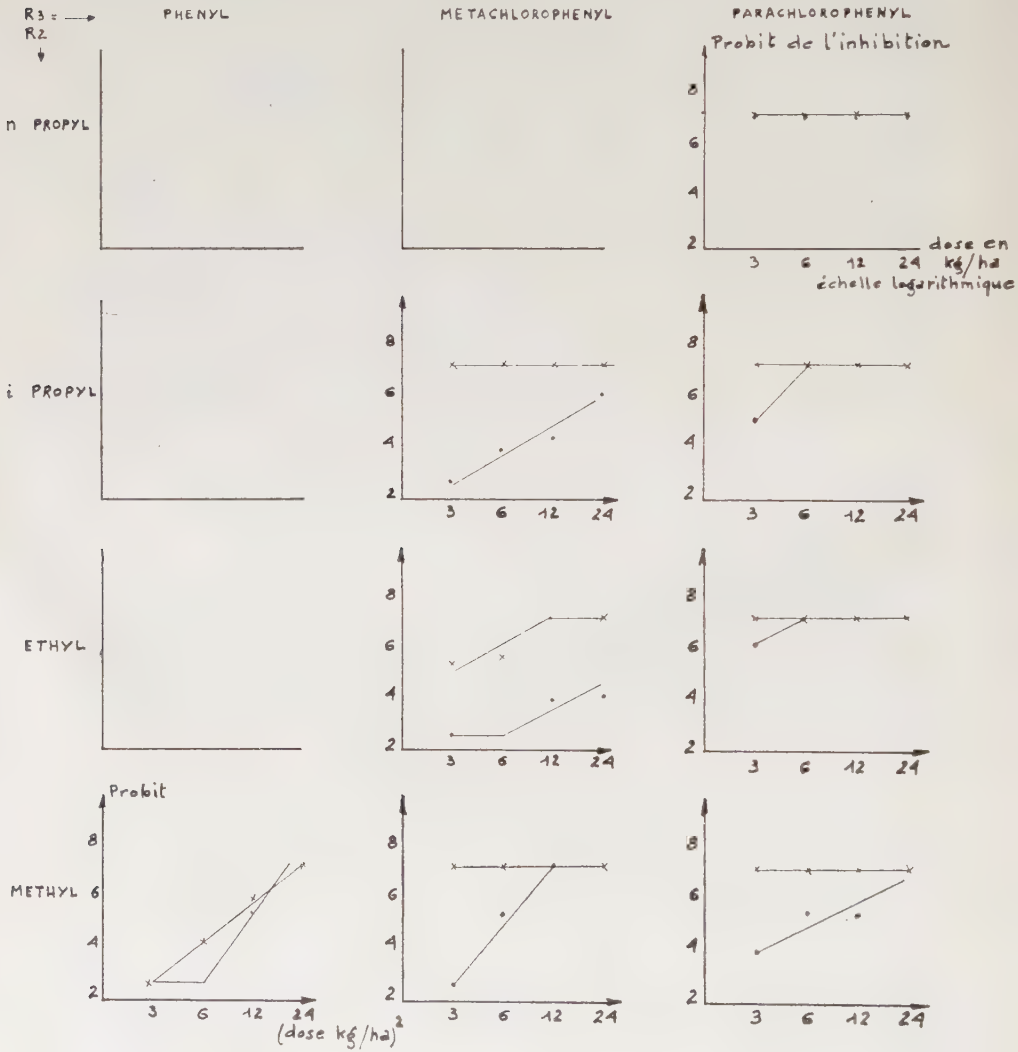
Les résultats obtenus sont schématisés dans les graphiques II-1 et II-2. Le probit de l'inhibition en poids frais (graphique II-1) ou en poids sec (graphique II-2) est porté en fonction du logarithme de la dose. Le probit varie de 2,67 pour une inhibition de 1 p. 100 à 7,33 pour 99 p. 100; il est égal à 5,0 pour une inhibition de 50 p. 100.

Nous observons bien entendu que le ralentissement de la croissance a été plus important dans le cas du Soja, pour lequel l'essai a duré 7 jours, que dans le cas des Pois, où la récolte a été faite 48 heures après le traitement.

L'alignement des points expérimentaux est en général satisfaisant et nous permet de différencier les composés d'après la dose nécessaire pour provoquer une inhibition de la croissance de 50 p. 100 ou de 100 p. 100. Ces valeurs sont regroupées dans le tableau II-1.

GRAPHIQUE II 1—Probit de l'inhibition de croissance en poids frais

- (.) Plantules vertes de *Pisum sativum* (durée de l'essai 48 heures)
(x) " " " *Glycine maximum* (" " " 7 jours)



GRAPHIQUE II 2 — Probit de l'inhibition de croissance en poids sec

(.) Plantules vertes de *Pisum sativum* (durée de l'essai 2 jours)
(x) " " " *Glycine maximum* (" " " 7 jours)

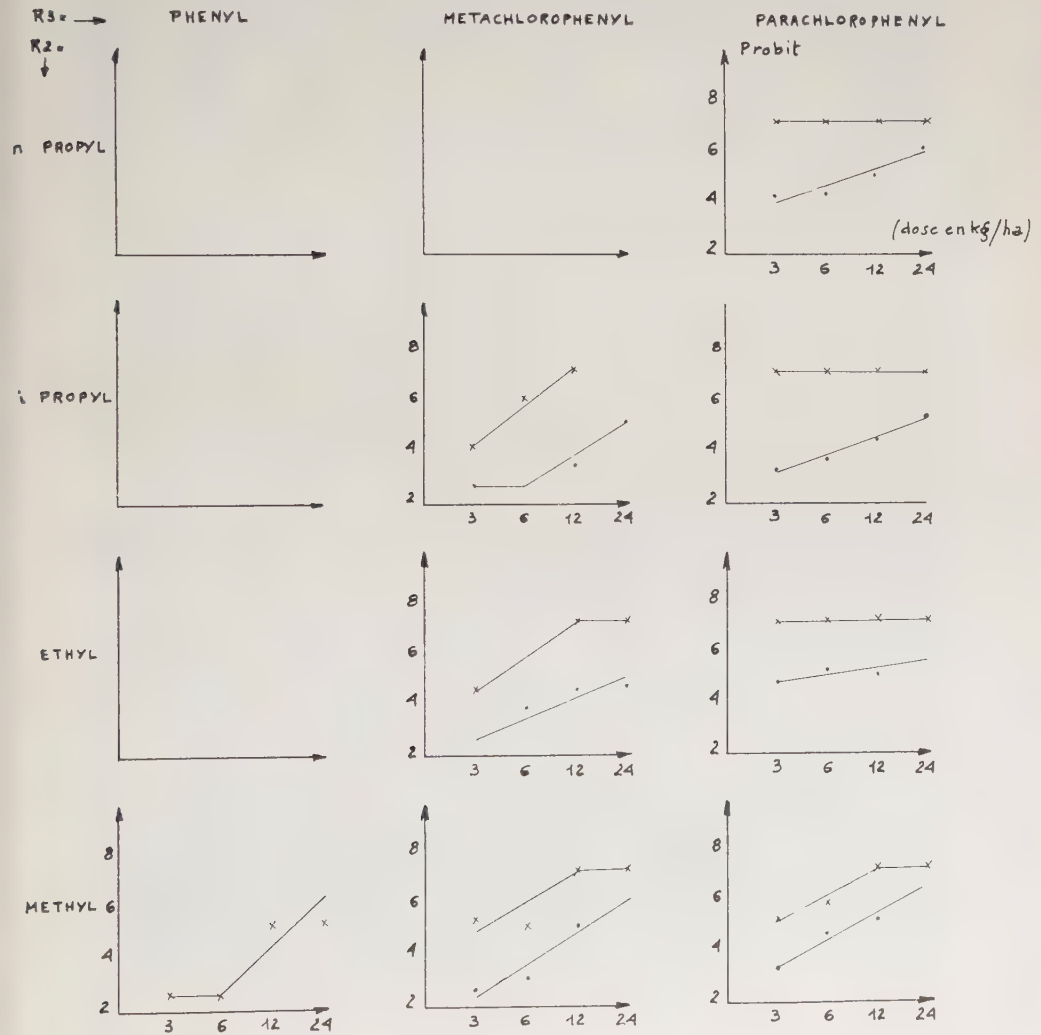


TABLEAU II-1

DOSE EN KILOGRAMMES PAR HECTARE
NÉCESSAIRE POUR PROVOQUER UNE INHIBITION DE LA CROISSANCE

	50 % en P.F.		100 % EN P.F.		50 % EN P.S.		100 % EN P.S.	
	Pois	Soja	Pois	Soja	Pois	Soja	Pois	Soja
pCPEOD . . .	< 3	< 3	6	< 3	4	< 3	> 24	< 3
pCPnPOD . . .	< 3	< 3	< 3	< 3	8	< 3	> 24	< 3
pCPiPOD . . .	3	< 3	6	< 3	15	< 3	> 24	< 3
pCPMOD . . .	6	< 3	> 24	< 3	9	< 3	> 24	12
mCPMOD . . .	6	< 3	12	< 3	12	< 3	> 24	12
PMOD . . .	11	11	> 24	24	14	15	> 24	> 24
mCPiPOD . . .	12	< 3	> 24	< 3	20	5	> 24	11
mCPEOD . . .	20	< 3	> 24	12	> 24	4	> 24	12

Les 3-parachlorophényl-oxazolidine-diones substituées en 5 par un radical éthyl, n. propyl ou iso-propyl sont sans conteste beaucoup plus actives que les autres : elles inhibent toutes trois la croissance en poids frais du Pois de 50 p. 100 en 2 jours et la croissance en poids sec du Soja de 100 p. 100 en 7 jours à une dose inférieure à 3 kilogrammes par hectare, ce qu'aucune autre n'a réalisé.

Il n'y a que peu de différence entre ces 3 composés qu'on peut donc considérer comme étant d'activité sensiblement égale (le dérivé isopropyl serait cependant, sur la base de l'inhibition de 100 % de la croissance en poids frais et du seuil 50 % en poids sec sur Pois, légèrement moins actif que les 2 autres). Réciproquement le dérivé phényl-méthyl (PMOD) est très nettement le moins actif, particulièrement sur le Soja. Entre ces deux extrêmes se situent un seul composé parachlorosubstitué (pCPMOD) et les 3 dérivés métachloro-phényl. La pCPMOD et la mCPMOD ont une activité sensiblement comparable, cependant il est nécessaire d'appliquer une dose supérieure à 24 kilogrammes du premier pour arrêter complètement la croissance en poids frais des Pois en 2 jours, alors qu'une dose de 12 kilogrammes du deuxième suffit. Les deux dérivés métachloro-phényl correspondant à $R_2 = \text{éthyl}$ ou isopropyl sont nettement moins actifs. On peut donc classer ces 9 produit de la façon suivante :

$$\begin{aligned} \text{pCPEOD} = \text{pCPnPOD} > \text{pCPiPOD} > \text{mCPMOD} > \text{pCPMOD} > \text{mCPiPOD} \\ &= \text{mCPEOD} > \text{PMOD}. \end{aligned}$$

Nous retiendrons donc qu'à une seule exception près les dérivés parachlorosubstitués sont très sensiblement plus actifs que leurs homologues métachlorosubstitués. Pour la seule substitution où la comparaison est possible, la présence d'un chlore sur le noyau phényl accroît l'effet inhibiteur. La comparaison entre substitutions alkyl en 5 ne donne pas de règle générale : pour les dérivés métachlorophényl, l'activité est maximum pour $R_2 = \text{méthyl}$, alors que pour les composés parachlorophényl, le maximum correspond à $R_2 = \text{éthyl}$ ou propyl.

2° SYMPTÔMES PRÉSENTÉS PAR LES PLANTES TRAITÉES

Les 9 composés retenus appliqués à des doses subléthales ne provoquent pas tous des symptômes analogues. On distingue aisément deux types de symptômes :

— Les uns provoqués par les produits non substitués ou métachlorosubstitués consistent en un raccourcissement des entrenœuds, pouvant donner un port en rosette caractérisé (voir fig. II-1). Les feuilles prennent fréquemment une coloration vert foncé



FIG. II 1. — Plantes de tomates.
De gauche à droite : Témoin. Traitées par 4, 8, 12 et 16 kg/ha de mCPMOD.

à reflets bleutés. Dans certains cas, par exemple celui des moutardes les plantes présentent une accumulation d'anthocyanes.

— Les autres, provoqués par les dérivés parachlorosubstitués, sont entièrement différents : les bourgeons terminaux se dessèchent en peu de jours, voire en quelques heures; des taches nécrotiques apparaissent rapidement sur les feuilles jeunes et s'étendent aux feuilles âgées, ce qui conduit à un flétrissement général (voir fig.

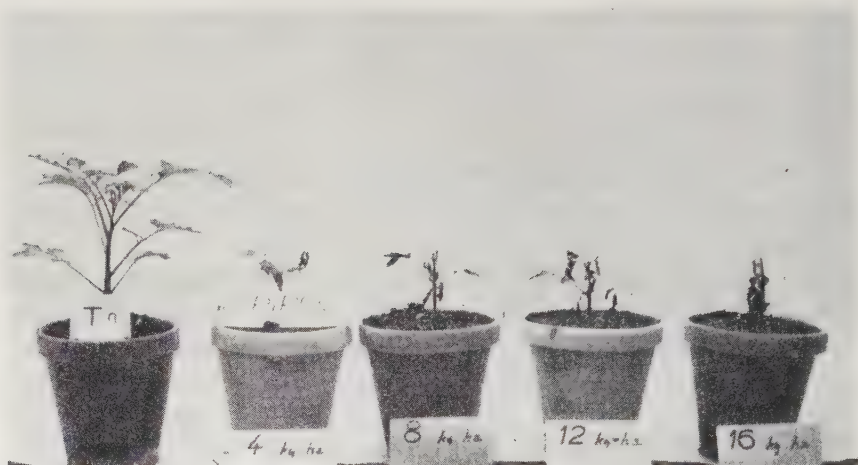


FIG. II 2. — Plantes de tomates.
De gauche à droite: Témoin. Traitées par 4, 8, 12 et 16 kg/ha de pCPI POD.

II-2). De jeunes plantes de tomates présentent dans les heures qui suivent le traitement un flétrissement des feuilles, caractéristique d'un trouble de l'approvisionnement hydrique.

— On note cependant que des doses élevées de dérivés méta-chlorophényl ou de PMOD provoquent des symptômes identiques à ceux observés avec les composés parachlorosubstitués.

Il est également intéressant de noter que ces mêmes dérivés parachlorosubstitués provoquent sur les plantes à feuilles divisées, telles que la tomate, la chélidoine, la moutarde, des effets morphogènes tout à fait spectaculaires.

C'est ainsi que chez la Chélidoine, 3 semaines après le traitement apparaissent des feuilles dont le limbe extrêmement réduit

déborde à peine de part et d'autre des nervures sans que le système de division foliaire soit altéré. Ces feuilles prennent un aspect lacinié très caractéristique. Puis dans les semaines suivantes, se développent des feuilles très différentes : non plus laciniées, mais



FIG. II 3. — Plante de Chélidoine ayant reçu une dose de pCPMOD correspondant à 15 kg/ha.
Remarquer les deux type de feuilles produits sous l'effet du traitement, les premières très laciniées, les secondes à limbe marqué et globuleux.

globuleuses, n'ayant que 1 ou 3 folioles à bords enroulés (voir fig. II-3)

Chez la moutarde, les feuilles qui apparaissent après le traitement sont pratiquement réduites à la nervure principale sur presque toute leur longueur et possèdent simplement un lobe terminal arrondi et gonflé.

Chez les Tomates enfin, le limbe est très déformé, la division en folioles est anarchique et rappelle les symptômes produits sur cette plante par certains virus. Ces symptômes apparaissent si les doses appliquées ne sont pas trop sévères. Les dérivés parachlorophényl-3-méthyl-5 et parachlorophényl-3-éthyl-5-oxazolidine-dione sont particulièrement actifs dans ce domaine. Nous n'avons pas approfondi la nature de cette action morphogène, qui sort du cadre de cette étude.

Notons seulement que cette action morphogène n'est pas attribuable à une interaction avec l'auxine. Les tests classiques : test de Went, de Thimann, sur la courbure du coléoptile d'avoine ou de tige des pois ont été constamment négatifs (MENORET, BILLAZ, MOREL (66)).

3^o VOIES DE PÉNÉTRATION

L'application de ces composés par voie uniquement foliaire (pulvérisation sur la partie aérienne, en protégeant le sol par une feuille de carton) ou par voie radiculaire (arrosage exclusif du sol, ou traitement en préémergence) provoque pour tous ces composés des symptômes identiques (port en rosette ou nécroses du bourgeon terminal). On observe seulement, dans le cas d'un traitement en arrosage, même si les plantes croissent sur du sable, un retard dans l'apparition de ces symptômes. Il n'est donc pas douteux que les deux voies de pénétration sont également possibles. Cependant compte tenu de l'effet de dilution dans le sol, du phénomène d'absorption et de la dégradation due à la microflore du sol, les traitements par pulvérisation sur les feuilles présentent une plus grande efficacité pratique.

Chapitre III

ACTION MITOCLASIQUE

La parenté des phényl-oxazolidine-diones avec les phényl-carbamates herbicides, du type IPC (phényl-carbamate d'isopropyl) et les symptômes provoqués par les dérivés non substitués ou méta-chlorosubstitués (port en rosette) nous ont fait envisager la possibilité d'une action directe sur les mitoses. Ces phényl-carbamates agissent en effet, en causant des troubles de la division cellulaire (IVENS et BLAKMAN (53)).

Nous avons donc observé les divisions cellulaires de méristèmes de racines d'orge, préalablement mises en contact avec des émulsions à base de Tween 80, contenant des doses croissantes des composés étudiés (BILLAZ et MOREL (12)). Nous avons retenu pour ces observations les 9 oxazolidine-diones les plus phytotoxiques, à savoir :
PMOD, mCPMOD, pCPMOD, mCPOED, pCPEOD, mCPnPOD,
pCPnPOD, mCPIPOD, pCPIPOD

Nous avons comparé leur action à celle du métachlorophényl carbamate d'isopropyle.

1° INHIBITION DE LA CROISSANCE

La croissance des racines, mesurée en millimètres par jour après le traitement, comparée à celle du témoin (traité au Tween seul), a été la suivante (tabl. III-1) : aucun des dérivés parachloro-substitués ne provoque d'inhibition de la croissance, même aux doses les plus élevées, sauf le dérivé méthyl (pCPMOD) qui entraîne un ralentissement de la croissance de 50 p. 100 environ à la dose $5.10^{-3}M$. Par contre tous les dérivés métachlorosubstitués inhibent la croissance et le dérivé PMOD également. L'inhibition est la plus faible pour les substitutions éthyl et propyl (n ou iso) : elle ne dépasse pas 65 p. 100 à $5.10^{-4}M$, alors qu'elle est de 100 p. 100

TABLEAU III 1

CROISSANCE DES RACINES D'ORGE TRAITÉES EN % DE CELLE DU TÉMOIN (*)
(Moyenne des 5 répétitions)

	CONCENTRATION MOLAIRES DE L'INHIBITEUR			
	$5 \cdot 10^{-6}M$	$5 \cdot 10^{-5}M$	$5 \cdot 10^{-4}M$	$5 \cdot 10^{-3}M$
phényl-3-méthyl-5. PMOD	103	98	0	0
m.-chloro-phényl-3-méthyl-5 mCPMOD	94	53	0	0
p.-chloro-phényl-3-méthyl-5 pCPMOD	—	120	81	48
p.-chloro-phényl-3-éthyl-5 pCPEOD	—	93	94	96
m.-chloro-phényl-3-éthyl-5 mCPEOD	—	17	38	9
m.-chloro-phényl-3-n-propyl-5 mCPnPOD	—	35	35	9
p.-chloro-phényl-3-n-propyl-5 pCPnPOD	—	—	133	115
p.-chloro-phényl-3-isopropyl-5 pCPiPOD	—	82	70	94
m.-chloro-phényl-3-isopropyl-5 mCPiPOD	—	33	36	23
m.-chloro-phényl-carbamate-d'isopro- pyl CIPC	9	0	0	0

(*) Mesurée après 72 heures pour les 3 premiers composés, après 48 heures pour les autres.

à la même dose pour le dérivé méthyl et pour le composé non substitué. Ce dernier paraît moins actif que la mCPMOD, puisqu'il est sans action à $5 \cdot 10^{-5}M$ alors que la mCPMOD provoque encore une inhibition de 50 p. 100 à cette même dose. Il ressort donc de ces résultats que la substitution en méta d'un chlore entraîne une augmentation d'activité et que pour les dérivés métachlorosubstitués, l'inhibition est maximum pour la substitution méthyl en 5.

On observe d'ailleurs aux doses provoquant une forte inhibition des intumescences caractéristiques à l'extrémité des racines.

2° OBSERVATIONS HISTOLOGIQUES

Les observations histologiques montrent nettement que ces différences sont dues à ce que seuls les composés métachloro ou non substitués ont une action mitoclasique, alors que les autres sont sans action sur les divisions cellulaires.

On sait qu'on distingue classiquement 3 grands types d'inhibition des divisions cellulaires (DEYSSON (37)).

— D'une part un simple ralentissement des divisions qui peut aller jusqu'à un arrêt total; cette action mitodépressive ou mitostatique correspond à une inhibition précédant la prophase avec ou sans inhibition concomitante de la prophase et de la télophase. On observe une diminution du nombre des divisions mais jamais de figures anormales.

— D'autre part une action chromatoclasique; il y a altération de la chromatine, fragmentation des chromosomes. C'est ce que l'on observe sous l'action des rayons X ou du nitrate de cobalt ou de nombreux composés organiques comme la coumarine. Ces agents sont souvent également mitodépresseurs.

— Enfin une altération du fonctionnement fusorial ou action mitoclasique (type colchicine), qui se manifeste par un désordre généralisé des chromosomes. A dose faible les agents mitoclasiques ne provoquent guère que des tropocinèses (l'axe fusorial est orienté d'une manière quelconque). Avec l'accroissement des doses on observe des mérostathmocinèses (altération ménagée) puis des stathmocinèses, se manifestant par le blocage des divisions en stathmométagphase, des chromosomes hyperspiralés, éventuellement associés à des dégénérescences pycnotiques. Aux mérostathmocinèses est associée l'inhibition du cloisonnement cellulaire (stathmodiérèse).

En aucun cas nous n'avons observé d'action chromatoclasique. Les perturbations provoquées par certains traitements sont nettement du type mitoclasique ou mitodépresseur.

On ne trouve pratiquement aucune activité mitoclasique sensible avec les composés substitués en para quel que soit le radical alkyl sur le carbone 5. On n'observe aucune anomalie aux doses faibles et quelques tropocinèses seulement à $5 \cdot 10^{-4}M$ et $5 \cdot 10^{-3}M$.

Les dérivés métachlorosubstitués ont par contre tous une certaine activité mitoclasique et mitodépressive.

Dans le cas du dérivé méthyl, cette activité est particulièrement intense à doses élevées; elle se manifeste par des stathmométagphases prolongées (hyperspiralisation des chromosomes) et généralisées. On arrive à la dose $5 \cdot 10^{-3}M$ à une polyploïdie très importante. Les cellules sont alors hypertrophiées et présentent des amas chro-

matiques remplissant presque tout le volume cellulaire (voir fig. III-1). Aux doses $5.10^{-5}M$ les troubles sont faibles (mérostharmacinèses assez rares, tropocinèses) et négligeables à $5.10^{-6}M$.

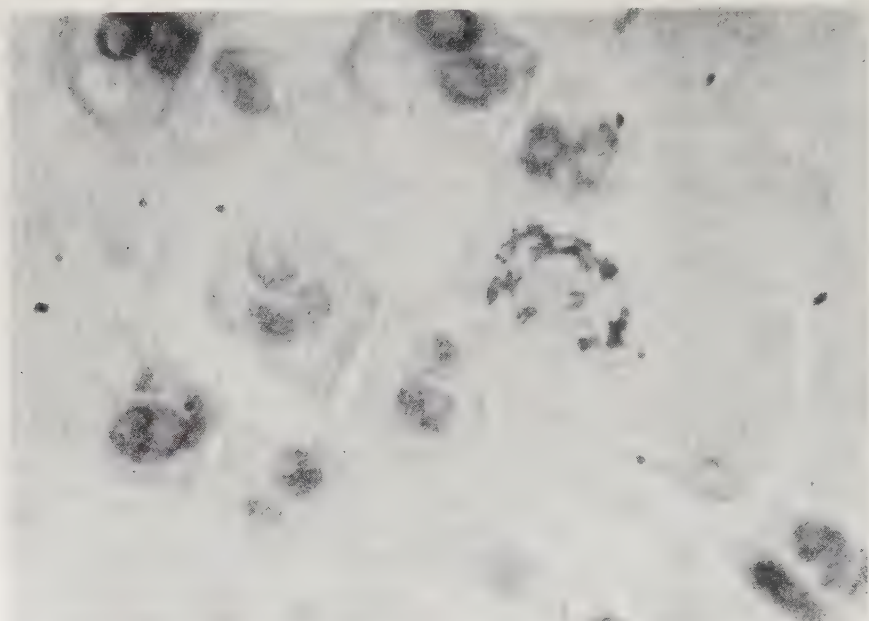


FIG. III 1. — Cellules de méristème de racines d'Orge après 48 heures de contact avec une émulsion titrant $5.10^{-3}M$ de mCPMOD.

Les dérivés éthyl et isopropyl ont une activité sensiblement plus faible. A $5.10^{-5}M$, on n'observe pratiquement aucune anomalie. A $5.10^{-4}M$, le dérivé éthyl provoque des stathmométaphases fréquentes, alors que le dérivé isopropyl en présente relativement peu. A $5.10^{-3}M$ on observe des stathmocinèses générales, sans polyploïdie importante comme avec le dérivé méthyl, avec une hyperspiralisation des chromosomes également moins accentuée. Les cellules sont hypertrophiées et la chromatine y est répartie en amas épars. L'activité mitoclasique paraît donc diminuer avec l'allongement de la chaîne latérale.

Le composé non substitué sur le noyau phényl a une activité mitoclasique moyenne, se manifestant par des mérostharmacinèses

fréquentes, à 5.10^{-4}M , quelques stathmométaphases à 5.10^{-3}M et des fragmentations de noyau. Il est sans action à 5.10^{-5}M et 5.10^{-6}M .

On observe également que le CIPC provoque, même aux doses les plus faibles, des troubles graves (stathmométaphases, amas chromatiques épars dans la cellule), ce qui correspond bien au fait qu'il est le seul à inhiber totalement la croissance à la dose 5.10^{-5}M . Les oxazolidines-diones étudiées sont donc sensiblement moins actives sur le trouble du fonctionnement fusorial. On note cependant qu'à dose élevée, le composé mCPMOD provoque des troubles plus spectaculaires que le CIPC (polyploidie extrêmement poussée).

3° CONCLUSION

Il n'est donc pas douteux que l'action mitoclasique puisse rendre compte pour une part importante de l'action herbicide des dérivés métachloro- ou non substitués. Il est intéressant de noter que les deux activités paraissent assez parallèles puisque le composé PMOD qui est le moins actif de ce groupe du point de vue herbicide, est également celui qui présente les troubles de la mitose les plus faibles, à dose égale et que la réciproque est vraie pour le composé mCPMOD (bonne activité herbicide, activité mitoclasique élevée).

Cependant les dérivés parachloro-substitués sont pour la plupart des herbicides actifs. Leur absence totale d'action mitoclasique oblige à envisager des modes d'action entièrement différents (qui pourraient d'ailleurs être partagés par les dérivés à action mitoclasique).

Chapitre IV

INHIBITION DE LA CROISSANCE DE PLANTULES DE SOJA PAR LA PARACHLOROPHÉNYL-3- ÉTHYL-5-OXAZOLIDINE-DIONE-2.4

Les expériences destinées à mettre en évidence le mode d'action des phényl-oxazolidine-diones-parachloro substituées ont été réalisées avec le dérivé éthyl-5 (pCPEOD), qui est, avec le dérivé *n* propyl, le plus actif de la série.

Notre but était d'étudier tout d'abord comment se manifeste l'action de cet inhibiteur sur la croissance de jeunes plantules depuis la germination, à l'obscurité, jusqu'au stade plante verte de 1 à 2 feuilles. Nous voulions ainsi observer si la sensibilité des plantes était la même pendant les phases obscures de la germination, et quand la croissance s'effectue à la lumière aux dépens des produits de la photosynthèse.

1° ORGANISATION DE L'EXPÉRIENCE

Dans ce but nous avons traité des plantules d'une part pendant leur germination à l'obscurité, en étuve, et d'autre part après repiquage en pot, en serre, à la lumière. Pour séparer clairement les stades où la plante vit encore pour une large part aux dépens de ses réserves cotylédonaire et celui où la photosynthèse assure seule son approvisionnement énergétique, nous avons effectué en serre des traitements échelonnés de 4 en 4 jours. Le déroulement de l'expérience était alors le suivant :

Des graines étaient mises à germer à l'étuve, à l'obscurité, à 28 °C. Elles étaient ultérieurement divisées en lots homogènes, qui étaient traités respectivement le 2^e, le 6^e, le 10^e et le 14^e jour. Les récoltes étaient effectuées 4 jours après le traitement: on mesurait le poids frais et le poids sec des plantules. A partir du 6^e jour, l'expé-

rience se déroulait à la serre : les plantules étant repiquées en pots, dans les conditions habituelles de nos essais.

Nous avons utilisé le soja comme plante test pour ces mesures. Le soja présente en effet le triple avantage d'être sensible à l'action de la pCPEOD, d'avoir une croissance rapide et de fournir des populations assez homogènes.

Les traitements consistaient en pulvérisation de pCPEOD à une dose correspondant à 4 kilogrammes par hectare. Dans le cas des plantules à la lumière, la formulation était réalisée à l'aide de DMFA et de Tween 85 dans les conditions précédemment définies : le volume de pulvérisation correspondait à 1 000 litres par hectare. Les plantules en germination à l'obscurité étaient traitées avec une émulsion à base de Tween 85 seul. La DMFA s'est en effet avérée avoir à ce stade une action inhibitrice propre importante. Pour l'utilisation immédiate au laboratoire il nous a été possible de réaliser des émulsions concentrées titrant 4 p. 1000 de pCPEOD, suffisamment stables pour qu'on puisse les pulvériser avant qu'elles ne précipitent. Il a fallu pour cela utiliser des quantités plus importantes de Tween dont la concentration pour une émulsion à 4 p. 1000 de pCPEOD était alors de 4 p. 100. Dans ces conditions l'émulsion à base de Tween seul n'avait que peu d'effet propre en pulvérisation à faible volume (0,01 ml/cm² de boîte de Petri).

Nous rapporterons donc dans tous les cas la croissance de plantules traitées à celle de plantules témoins ayant reçu une pulvérisation à base de l'émulgateur seul.

L'expérience était organisée de façon à permettre une interprétation statistique des résultats (5 répétitions disposées en blocs de Fisher).

2^o RÉSULTATS

A) *Croissance à l'obscurité*

Le traitement de plantules à l'obscurité s'est montré absolument sans effet. L'aspect des plantules traitées était tout à fait normal, et leur croissance en poids frais égale à celle des témoins : pour un accroissement de poids frais d'une plantule témoin du

2^e au 6^e jour de 515 milligrammes, celui d'une plantule traitée était de 545 milligrammes (différence non significative).

Cette expérience confirme donc les résultats rapportés au chapitre précédent, où nous avons vu que la pCPEOD n'avait pas provoqué d'inhibition de la croissance de racines d'orge, même après 48 heures de contact avec des émulsions titrant $5.10^{-3}M$. Ce mode de traitement est en fait beaucoup plus sévère, puisque les plantules ont été en contact avec un volume 10 à 20 fois plus élevé d'émulsion concentrée.

Reprenant des expériences de ce type avec des sojas, nous avons trouvé qu'il faut laisser en contact 4 jours les racines des plantules avec une émulsion titrant $5.10^{-3}M$ de pCPEOD pour provoquer une inhibition, significative, de la croissance de 50 p. 100.

Les plantules en germination à l'obscurité sont donc peu sensibles à l'action de la parachlorophényl-3 éthyl-5 oxazolidine dione-2.4 puisqu'il n'y a aucune inhibition si le traitement est fait par pulvérisation à une dose correspondant à 4 kilogrammes par hectare. Or en mesurant la phytotoxicité de ce composé (chap. II) nous avons trouvé qu'un traitement à 3 kilogrammes par hectare inhibait complètement la croissance des sojas cultivés en serre. *On peut donc considérer qu'aux doses herbicides normales les plantules en germination à l'obscurité sont insensibles à l'action de la pCPEOD.*

B) Croissance à la lumière

a) *Croissance observée.* — L'évolution des plantes au cours de cette expérience est représentée dans la figure IV-1. On voit que les témoins ont eu une croissance active :

— entre le 6^e et le 10^e jour, les cotylédons se sont entrouverts et les feuilles cotylédonaires ont commencé à se développer. On a observé d'ailleurs un verdissement très rapide des plantules dès qu'elles ont été repiquées à la lumière;

— entre le 10^e et le 14^e jour, les feuilles cotylédonaires se sont développées complètement et l'axe épicotylé s'est allongé d'une façon importante;

— du 14^e au 18^e jour, une feuille vraie a été formée.

A ces 3 stades, le traitement a provoqué :

— une inhibition complète du développement des feuilles cotylédonaire;

— ultérieurement le flétrissement des feuilles cotylédonaire formées et l'inhibition de la formation de nouveaux tissus.



FIG. IV-1. — Action de la parachlorophényl-3-éthyl-5-oxazolidine-dione-2,4 sur des plantules de Soja.

En bas : plantes traitées, soit, de gauche à droite :

- plantes traitées le 2^e jour et récoltées le 6^e (à l'obscurité);
- plantes traitées le 6^e jour et récoltées le 10^e (à la lumière);
- plantes traitées le 10^e jour et récoltées le 14^e (à la lumière);
- plantes traitées le 14^e jour et récoltées le 18^e (à la lumière).

En haut : plantes témoins, récoltées au même stade.

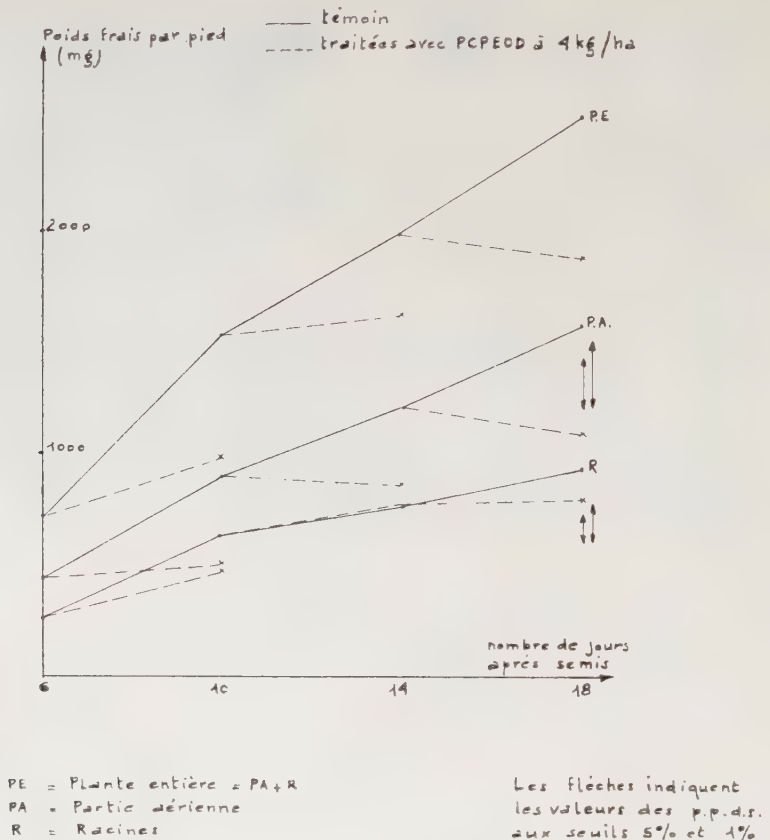
Il est manifeste en particulier que les parties aériennes de plantes traitées sont restées au stade de croissance où elles se trouvaient au moment du traitement. *Il y a donc eu inhibition complète de la croissance des tissus aériens.*

Accessoirement la figure IV-1 illustre l'absence d'action de la pCPEOD sur des plantules en germination à l'obscurité.

b) *Croissance mesurée.* — Les graphiques IV-1 et IV-2 présentent l'évolution du poids frais et du poids sec par pied. Nous y

avons figuré par des flèches les valeurs des plus petites différences significatives (p.p.d.s.) aux seuils 5 p. 100 et 1 p. 100 pour les racines et pour les parties aériennes, dont les récoltes ont été pesées séparément.

GRAPHIQUE IV 1 Croissance en poids de matière fraîche de
plantules de sojas à la lumière



Croissance en poids frais (graphique IV-1)

Les résultats confirment les observations faites sur les parties aériennes : aux 3 stades le traitement a provoqué une inhibition totale, très significative, de leur croissance. Celle des racines a été

généralement moins ralentie : elle est de 45 p. 100 du 6^e au 10^e et de 82 p. 100 du 14^e au 18^e (dans ces 2 cas elle est statistiquement significative). Il n'y a pas d'inhibition du 10^e au 14^e jour.

La croissance de la plante entière est ainsi inhibée de 68 p. 100 pendant le 1^{er} stade, de 72 p. 100 pendant le 2^e et de 100 p. 100 pendant le 3^e, au cours duquel on observe même une perte de poids.

Il semble donc que l'inhibition s'accroît du 1^{er} au 3^e stade. Les résultats de la croissance en poids sec vont nous permettre de confirmer ce point de vue.

Croissance en poids sec (graphique IV-2)

L'évolution du poids sec par pied met nettement en évidence le passage de la phase « cotylédonaire » à la phase photosynthétique :

— Du 6^e au 10^e jour les parties aériennes des plantules témoins perdent 25 p. 100 de leur poids; cette baisse traduit évidemment l'utilisation de réserves cotylédonaire au profit de la croissance en poids sec des racines et du développement des feuilles cotylédonaire. Le poids sec total de la plantule baisse finalement de 7 p. 100 : les oxydations respiratoires l'emportent encore très nettement sur la photosynthèse.

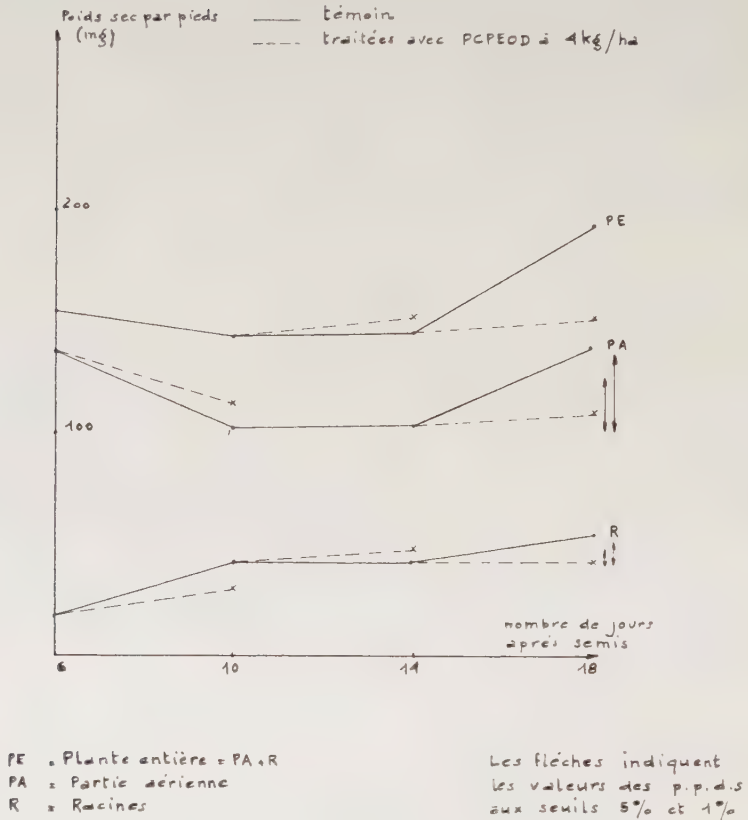
— Du 10^e au 14^e jour, le poids sec de la partie aérienne et des racines reste constant : il y a donc compensation entre les gains dus à la photosynthèse et les pertes d'origine respiratoire.

— Du 14^e au 18^e jour, il y a accroissement très significatif du poids sec, pour la partie aérienne (+ 35 %) comme pour les racines (28 %). La photosynthèse l'emporte alors très nettement. La phase « cotylédonaire » de la croissance est terminée.

Quelle est à ces différents stades l'influence du traitement?

— Au premier (6^e-10^e j) les courbes de croissance en poids sec ne montrent qu'un retard dans la formation du système racinaire de 50 p. 100 (cette différence est significative) et un retard complémentaire dans la baisse de poids de la partie aérienne. Il semble donc qu'il y ait une moindre utilisation des réserves cotylédonaire.

GRAPHIQUE IV 2 Croissance en poids de matière sèche de
plantules de sojas à la lumière



— Au deuxième, il n'y a aucun effet sensible sur la croissance des parties aériennes et des racines, qui reste stationnaire.

— Au troisième, par contre, la croissance de la partie aérienne est totalement arrêtée, celle des racines est inhibée de 85 p. 100, la croissance totale l'étant de 90 p. 100 (toutes ces différences sont hautement significatives).

Donc dès qu'il y a accumulation de matière sèche, la photosynthèse l'emportant nettement sur la respiration, le traitement provoque une inhibition presque totale de cette accumulation.

3° DISCUSSION

En résumé, les traitements effectués à la lumière ont provoqué les effets suivants :

— du 6^e au 10^e jour : le développement des feuilles cotylédonaire a été complètement inhibé; la croissance des racines (en poids sec) a été ralentie de moitié et celle de la plantule entière (en poids frais) de 68 p. 100.

— du 10^e au 14^e jour : nous avons observé une inhibition totale de la formation de nouveaux tissus aériens (bourgeon, feuilles cotylédonaire et tige) et mesuré un ralentissement de la croissance en poids frais de la plantule entière de 72 p. 100.

— Du 14^e au 18^e jour : le traitement a arrêté toute croissance, aussi bien la formation de la première feuille vraie que celle de nouvelles racines.

La formation de nouveaux tissus aériens a donc toujours été inhibée par le traitement. Par contre la croissance des racines n'a été que partiellement ralentie tant que la plante a vécu aux dépens de ses réserves cotylédonaire.

Il est donc manifeste qu'aux doses normales d'emploi il n'y a inhibition qu'à la lumière, et que cette inhibition n'affecte la plante entière que lorsque celle-ci ne vit plus qu'aux dépens de la photosynthèse.

Il semblerait ainsi hautement probable que la pCPEOD agit sur les processus photosynthétiques. Il paraît également probable qu'aux doses herbicides normales de 4 kilogrammes par hectare ce mode d'action est de loin le plus important : nous aurions autrement observé une inhibition de la croissance à l'obscurité. Nous reviendrons toutefois sur ce point après avoir vérifié de validité de l'hypothèse concernant l'inhibition des processus photosynthétiques et recherché les causes possibles du ralentissement de la croissance à l'obscurité en présence de fortes quantités de pCPEOD.

Nous envisagerons donc successivement l'étude de l'action inhibitrice de la pCPEOD sur la photosynthèse, *in vivo* sur des plantes traitées (chap. V), *in vitro* sur des chloroplastes isolés (chap. VI) et celle de l'interaction possible avec la respiration et les phosphorylations oxydatives de mitochondries d'organes étioles (chap. VII).

Chapitre V

INHIBITION DE LA FIXATION DE CO₂ PAR DES PLANTES ENTIÈRES

La fixation de CO₂ représente l'aboutissement du déroulement sans heurt de la machinerie biochimique de la photosynthèse : transport d'électrons, réduction de NADP, phosphorylations et déroulement du cycle de CALVIN (10). Elle constitue donc un critère de choix pour déterminer sur des plantes entières si les processus photosynthétiques se déroulent normalement. Nous avons donc recherché dans les conditions expérimentales décrites plus haut, si des plantes préalablement traitées avec certains composés fixaient ¹⁴CO₂ de la même façon que des plantes témoins (ne recevant que le mélange ayant servi à la formulation).

1° ACTION DE LA PARACHLOROPHÉNYL-3-ÉTHYL-5-OXAZOLIDINE-DIONE-2.4

Les premières expériences ont été réalisées avec la parachlorophényl-3-éthyl-5-oxazolidine-dione-2.4 (pCPEOD). Les plantes avaient été traitées 24 et 48 heures avant la mesure par pulvérisation avec des doses de 3 et 5 kilogrammes par hectare de pCPEOD, formulé au Tween 80 seul. Après une heure de contact avec 500 µc de ¹⁴CO₂, nous avons obtenu les chiffres consignés dans le tableau V-1.

Ils nous montrent que pour les tomates traitées, la fixation n'est plus après 24 heures que 50 à 60 p. 100 de celle des plantes témoins, et qu'elle baisse après 48 heures à 30-35 p. 100. Pour les sojas le traitement provoque dès 24 heures une inhibition de la fixation de 60 à 70 p. 100, qui reste constante après 48 heures.

Le traitement avec la pCPEOD se manifeste donc par une très forte inhibition de la photosynthèse, ce qui paraît confirmer l'hypo-

TABLEAU V-1

FIXATION DE $^{14}\text{CO}_2$ PAR DES PLANTES TRAITÉES AVEC pCPEOD
(c.p.m. par plante)

	TOMATES	SOJAS
Témoins non traités.	290 000 (100)	148 200 (100)
24 h après traitement { 3 kg/ha	176 000 (61)	59 300 (40)
correspondant à une dose de { 5 kg/ha	162 500 (56)	43 500 (29)
48 h après traitement { 3 kg/ha	88 000 (30)	58 300 (39)
correspondant à une dose de { 5 kg/ha	104 250 (36)	46 800 (32)

thèse que nous avaient suggérée les courbes de croissance des plantes traitées.

Cependant il n'est pas impossible d'attribuer cet effet inhibiteur 48 heures après le traitement à des effets secondaires. Aussi avons-nous réalisé une deuxième expérience où les délais d'action de la pCPEOD étaient de 16 et 24 heures respectivement (tabl. V-2).

TABLEAU V-2

FIXATION DE $^{14}\text{CO}_2$ PAR DES PLANTES TRAITÉES AVEC pCPEOD
(c.p.m. par plante)

	TOMATES	SOJAS
Témoins non traités.	346 000 (100)	211 250 (100)
16 h après traitement { 3 kg/ha	166 000 (48)	50 500 (24)
à une dose correspondant à { 5 kg/ha	167 000 (48)	50 000 (24)
24 h après traitement { 3 kg/ha	189 000 (54)	60 600 (29)
à une dose correspondant à { 5 kg/ha	134 000 (38)	57 750 (27)

Ces nouvelles mesures mettent en évidence la rapidité avec laquelle l'inhibition se manifeste, particulièrement avec les sojas où elle est la même (70 %) après 16 heures qu'après 48 heures. Avec les tomates, la fixation est ralentie de 50 p. 100 dès 16 heures. Ceci rend donc probable l'intervention de la pCPEOD directement au niveau des processus photosynthétiques.

2° ACTION DE TROIS AUTRES OXAZOLIDINE-DIONES

La question se pose alors de savoir si la propriété d'inhiber la fixation de $^{14}\text{CO}_2$ est propre à la pCPEOD ou si d'autres composés voisins la possèdent également. Nous avons donc comparé dans deux expériences quatre oxazolidine-diones à ce point de vue. Nous avons choisi en plus de la pCPEOD, la pCPMOD (para-chlorophényl-méthyl), la mCPMOD (méta-chlorophényl-méthyl) et la PMOD (phényl-méthyl).

On se souvient que ces deux derniers composés sont des mito-inhibiteurs. Dans la première expérience (tabl. V-3) des plantules de

TABLEAU V-3
FIXATION EN 1 000 c.p.m./PLANTE (16 H APRÈS TRAITEMENT)
(doses appliquées exprimées en kg/ha)

TÉMOIN	2.4.D.	PMOD		mCPMOD		pCPMOD		pCPEOD	
	1	5	10	5	10	5	10	5	10
260 (100)	260 (100)	315 (121)	305 (117)	207 (80)	263 (101)	282 (109)	282 (109)	89 (34)	49 (19)

sojas ont été traitées 16 heures avant la fixation par des doses de 5 et 10 kilogrammes par hectare de ces 4 composés, formulés au Tween et pulvérisés sur les parties aériennes. On avait inclus un témoin normal et un témoin traité par 1 kilogramme par hectare de 2.4.D. (traitement qui provoqua en 16 h des symptômes déjà très marqués) afin de vérifier que l'inhibition de la fixation de $^{14}\text{CO}_2$ n'était pas une conséquence secondaire de l'action herbicide. Dans ces conditions nous n'avons trouvé d'inhibition de la fixation de CO_2 qu'avec pCPEOD (65 % d'inhibition à 5 kg/ha, 80 % à 10 kg/ha). Les autres traitements, y compris le 2.4.D., sont sans effet.

Dans la deuxième expérience (tabl. V-4) des plantules de sojas étaient traitées 48 heures avant la fixation par les doses courantes

d'emploi nécessaires pour provoquer un arrêt complet de la croissance, soit 4 kilogrammes par hectare pour pCPEOD, 8 kilogrammes par hectare pour mCPMOD, 16 kilogrammes par hectare pour pCPMOD et PMOD.

TABLEAU V-4

FIXATION EN 1 000 c.p.m./PLANTE (48 H APRÈS TRAITEMENT)
(doses appliquées exprimées en kg/ha)

TÉMOIN	PMOD (16)	mCPMOD (8)	pCPMOD (16)	pCPEOD (4)
196 (100)	84,5 (42)	110,5 (56)	78 (40)	68,2 (35)

La formulation était toujours à base de Tween. On a alors trouvé dans tous les cas une inhibition de 45 à 65 p. 100. Elle est la plus faible avec le dérivé mCPMOD (45 %), elle est la plus forte pour pCPEOD (65 %), et égale pour les deux autres composés (60 %).

Ces deux expériences nous montrent que l'action inhibitrice est très probablement une action directe au niveau des processus photosynthétiques et non une conséquence secondaire. En effet le 2.4.D, à la dose de 1 kilogramme par hectare (dose létale pour le soja) ne provoque aucune inhibition de la fixation de CO₂ dans les 16 heures qui suivent le traitement.

Il en résulte que :

— D'une part la propriété d'inhiber la fixation de CO₂ n'est pas liée à la molécule de pCPEOD exclusivement. De faibles variations de la structure chimique n'altèrent pas complètement cette propriété.

— D'autre part il existe une période de latence correspondant probablement à un délai de translocation sur les sites actifs. Ce délai est particulièrement net dans le cas du dérivé mCPMOD qui à la dose de 10 kilogrammes par hectare n'entraîne après 16 heures aucune inhibition alors qu'à 8 kilogrammes par hectare il provoque après 48 heures une inhibition de 45 p. 100.

3° MISE EN ÉVIDENCE D'UNE PÉRIODE DE LATENCE ENTRE LE TRAITEMENT ET LA MANIFESTATION DE L'INHIBITION

L'existence de ce délai a été confirmée pour la pCPEOD par les deux expériences suivantes. Dans la première (tabl. V-5) réalisée sur plantules de sojas (âgées de 15 j environ) et de tomates (âgées de 7 semaines environ) la fixation de $^{14}\text{CO}_2$ a été effectuée 7 heures

TABLEAU V-5
(FIXATION EN 1 000 c.p.m.) TRAITEMENT 7 H AVANT LA FIXATION

	TOMATES	SOJAS
Témoin	170	304
pCPEOD traitement { 2 kg/ha	165	291
correspondant à { 4 kg/ha	155	348

après le traitement, à 2 et 4 kilogrammes par hectare avec une formulation à base de DMFA et de Tween. Dans la seconde (tabl. V-6) on a laissé le traitement agir 1, 4 et 6 jours avant la fixation de $^{14}\text{CO}_2$, pour observer l'évolution de l'inhibition en fonction du temps. Dans cette dernière expérience les plantes de sojas, âgées de 3 semaines, recevaient un traitement avec pCPEOD à 4 kilogrammes par hectare, formulation DMFA + Tween. Nous avons exprimé les résultats de cette expérience en cpm par gramme de matière sèche car en 6 jours la croissance peut être appréciable.

TABLEAU V-6
FIXATION EN 1 000 c.p.m./GRAMME DE M.S.

Témoin	3 815 (100)
1 jour	681 (18)
4 jours	651 (17)
6 jours	569 (15)

On voit que 7 heures après la pulvérisation, la pCPEOD n'a encore aucune action. La période de latence se situe donc, dans nos

expériences, entre 7 et 16 heures. L'inhibition atteint très rapidement son maximum, puisqu'il n'y a pratiquement pas de différence entre l'inhibition que l'on observe 1 ou 6 jours après le traitement.

4^o CONCLUSION

Ces résultats confirment donc la possibilité d'une intervention directe sur les processus de la photosynthèse; cette action serait commune aux trois autres oxazolidine-diones expérimentées, mais avec des seuils d'activité très différents. Il est intéressant de noter que le classement de ces quatre composés du point de vue phytotoxicité et du point de vue inhibition de la fixation de CO_2 est le même : pCPEOD > mCPMOD > PMOD et pCPMOD. Ceci nous laisse supposer que cette propriété puisse jouer un rôle essentiel dans l'action herbicide.

Il convient cependant de savoir si la même inhibition peut être observée *in vitro*, ce qui permettra de savoir si c'est la molécule de phényl-oxazolidine-dione qui agit en tant que telle ou si c'est une forme de transformation qui est active, et de s'assurer que ce sont bien les mécanismes photosynthétiques qui sont perturbés, et non des fonctions annexes, comme par exemple l'ouverture des stomates, et enfin de déterminer lequel des processus biochimiques est inhibé.

Pour ce faire, nous avons limité notre étude à la pCPEOD, la plus active, et cherché quelle était son action *in vitro*, sur les réactions lumineuses effectuées par des chloroplastes d'épinards et de choux chinois.

Chapitre VI

ACTION *IN VITRO* DE LA PARACHLOROPHÉNYL-3-ÉTHYL-5- OXAZOLIDINE-DIONE-2.4 SUR DES CHLOROPLASTES ISOLÉS

1° FIXATION DE CO₂

La fixation de CO₂ peut être réalisée avec un rendement appréciable avec le « système reconstitué » réalisé par LOSADA, TREBST et ARNON (61). Dans ce système on utilise d'une part les chloroplastes éclatés dans une solution de 0,035 M NaCl (C1S) qui assurent, moyennant l'addition de cofacteurs solubles appropriés, le déroulement du transport d'électrons, la phosphorylation couplée à ce transfert et éventuellement la phosphorylation cyclique (sans dégagement d'oxygène) et d'autre part l'extrait de chloroplastes (EAC) qui contient les enzymes nécessaires au déroulement du cycle de CALVIN (BASSHAM et CALVIN (10)).

C'est donc avec un tel système que nous avons étudié, *in vitro*, l'inhibition de la fixation de CO₂ par la pCPEOD.

A. — Fixation de CO₂ dans un système catalytique illuminé

Trois expériences ont d'abord été réalisées avec un système dit catalytique en ADP et NADP, c'est-à-dire qu'il contient respectivement 0,5 et 0,4 μ M d'ADP et de NADP par fiole (tabl. VI-1).

Dans un tel système, l'assimilation réductrice du CO₂ doit nécessairement s'effectuer à la lumière; l'énergie lumineuse sert à régénérer continuellement l'ATP et le NADPH₂ présents en quantités catalytiques seulement : l'ATP est utilisé dans la phosphorylation du Ru5P en RuDP et de l'APG en ADPG; le NADPH₂ est consommé dans la réduction de l'ADPG en triose phosphate.

L'addition à un tel système d'un cofacteur cyclique, FMN ou PMS, en quantité microcatalytique (0,001 μ M) augmente nettement la quantité de CO₂ fixée et le pourcentage des sucres phosphates, par rapport au phosphoglycérate, dans l'ensemble des produits de la fixation (TREBST, LOSADA et ARNON (102)).

TABLEAU VI-1
INHIBITION DE LA FIXATION DE CO₂ A LA LUMIÈRE
PAR DES CHLOROPLASTES D'ÉPINARD
(Fixation en 1 000 c.p.m./fiole)

EXP.	TENEUR EN CHLOROPHYLLE DU C ₁ S (mg / fiole)	COFACTEUR CYCLIQUE 0,001 μ M / fiole	INHIBITEUR			
			0	3.10 ⁻⁴ M	1,7.10 ⁻³ M	3.10 ⁻³ M
1	0,75	FMN	538 (100)	271 (50)	—	65 (12)
2	1,5	FMN	980 (100)	931 (95)	245 (25)	—
3	1,5	PMS	814 (100)	687 (84)	309 (38)	—

Milieu réactionnel en μ M / 3 ml : TRIS-HCl pH 7,5 : 80; MgCl₂ : 5; MnCl₂ : 2; Ascorbate de sodium : 10; K₂HPO₄ : 5; R5P : 1; Glutathion : 1; NaH¹⁴CO₃ : 10; ADP : 0,5; NADP : 0,4; EAC : 0,75 ml préparé à partir d'une suspension de chloroplastes contenant 2 mg chlorophylle par ml; chloroplastes, cofacteurs de la phosphorylation cyclique et inhibiteur : quantités indiquées dans le tableau.

Le tableau VI-1 montre que, dès la concentration de 1,7 10⁻³M, la pCPEOD inhibe fortement la fixation de CO₂ (60 à 75 %). L'inhibition, qui est négligeable à 3.10⁻⁴M dans les expériences 2 et 3, est au contraire importante dans l'expérience 1. Cette différence est sans doute attribuable au rapport de la quantité de chlorophylle à celle d'inhibiteur, plus forte dans les expériences 2 et 3 (1,5 mg de chlorophylle par fiole) que dans la première (0,75 mg de chlorophylle par fiole).

Ces expériences confirment donc les résultats obtenus sur des plantes entières. Elles nous montrent également que c'est la molécule de pCPEOD elle-même et non d'éventuels produits de transformation dans la plante, qui est inhibitrice.

B. — *Fixation de CO₂ à l'obscurité en présence d'ATP et de NADPH₂*

Il reste cependant à déterminer lequel des processus concourant à la fixation de CO₂ est inhibé. Il existe trois groupes d'inhibiteurs des réactions photosynthétiques : 1° ceux qui interfèrent avec le transport d'électrons, comme l'herbicide CMU (3-*p*-chlorophényl 1-1-diméthyl-urée) (BISCHOP (15)); 2° ceux qui désaccouplent les phosphorylations photosynthétiques (comme l'ion ammonium) et 3° ceux qui inhibent une enzyme intervenant dans le cycle de Calvin, comme l'ion cyanure par exemple, qui inhibe la ribulosediphosphate-carboxylase (TREBST, LOSADA et ARNON (103)). Il n'est évidemment pas exclu qu'un composé inhibe plusieurs types de réaction.

Dans tous les cas, l'inhibition supprime la fixation de CO₂.

Or on peut déterminer si l'inhibition porte sur les phases obscures de la fixation de CO₂ ou sur les phases lumineuses en dissociant les réactions purement photosynthétiques des autres. En effet, la fixation de CO₂ peut se dérouler à l'obscurité, comme l'ont montré TREBST, TSUJIMOTO et ARNON (101), à condition de fournir au système de l'ATP et du NADPH₂. Nous avons réalisé un tel système photosynthétisant d'abord ATP et NADPH₂ en quantités substrat par des chloroplastes illuminés pendant 7 minutes (temps nécessaire à la réduction du NADP mesuré manométriquement par le dégagement d'oxygène); puis en injectant dans le mélange réactionnel précédent, à l'obscurité, le ¹⁴CO₃HNa et l'inhibiteur

TABLEAU VI-2
FIXATION DE CO₂ PAR DES CHLOROPLASTES D'ÉPINARD
A L'OBSCURITÉ, EN PRÉSENCE DE pCPEOD

INHIBITEUR (M)	FIXATION TOTALE (cpm / fiole)
0	67 000 (100)
3.10 ⁻⁴ M	67 000 (100)
1,6.10 ⁻³ M	57 000 (86)

Milieu réactionnel :

Comme dans le tableau VI-1, sauf : ADP : 2,5 μM, NADP : 2,0 μM.

Le glutathion, le NaH ¹⁴CO₃ et l'inhibiteur sont ajoutés à l'obscurité après 7 minutes d'illumination.

C₁S : 0,5 mg de chlorophylle, EAC : 1 ml préparé à partir d'une suspension de C₁S à 2 mg de chlorophylle par ml.

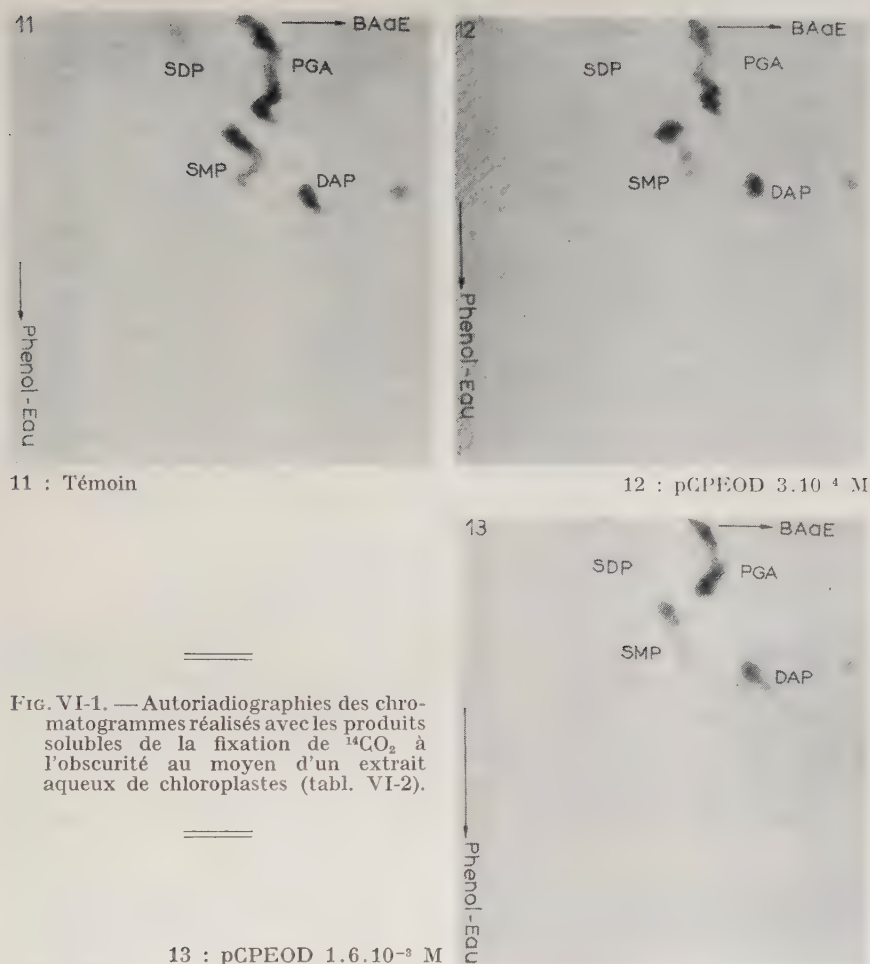


FIG. VI-1. — Autoradiographies des chromatogrammes réalisés avec les produits solubles de la fixation de $^{14}\text{CO}_2$ à l'obscurité au moyen d'un extrait aqueux de chloroplastes (tabl. VI-2).

et en laissant se dérouler les réactions obscures pendant 20 minutes.

Les cofacteurs utilisés étaient les mêmes que dans les expériences précédentes, avec les exceptions suivantes : on avait apporté des doses substrat d'ADP et NADP, respectivement 2,5 et 2,0 μM par fiole, et l'on avait ajouté du glutathion, du $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ et l'inhibiteur à la fin de la période d'illumination. Enfin, le C_1S contenait 0,5 mg de chlorophylle par fiole et l'EAC 2,0.

Bien que la fixation de CO_2 obtenue avec un tel système soit

toujours plus faible que celle donnée par un système catalytique, le tableau VI-2 montre qu'il n'y a pratiquement pas d'inhibition : elle ne dépasse pas 14 p. 100 à $1,6 \cdot 10^{-3}M$, concentration à laquelle la fixation de CO_2 par le système catalytique à la lumière est très ralentie. La pCPEOD est donc pratiquement sans action sur les enzymes du cycle de Calvin. On en trouve une confirmation dans l'examen des produits de la fixation déterminés par chromatographie des extraits et autoradiographie. On voit (fig. VI-1) qu'en présence ou en absence d'inhibiteur on trouve les mêmes proportions de sucres diphosphates (SDP), sucres monophosphates (SMP), dihydroxy-acétone-phosphate (DAP) et acide phosphoglycérique (PGA).

La pCPEOD agit donc soit sur le transport d'électrons, soit sur la photophosphorylation. Les expériences suivantes montrent qu'il n'y a en fait aucune interférence sensible avec le transport d'électrons et que la pCPEOD agit comme un découplant.

2° TRANSPORT D'ÉLECTRONS ET PHOTOPHOSPHORYLATION

Nous avons mesuré, dans un système comprenant tous les cofacteurs de la fixation de CO_2 mais sans addition de CO_3HNa , quelles étaient les quantités de NADP réduites et celles de Phosphore minéral estérifié à la lumière en absence et en présence de pCPEOD. Le système comprenait des quantités substrat de NADP et d'ADP (2,0 et 2,5 μM).

TABLEAU VI-3

ACTION DE LA pCPEOD SUR LE DÉGAGEMENT D'OXYGÈNE ET LA PHOSPHORYLATION COUPLÉE PAR DES CHLOROPLASTES D'ÉPINARD À LA LUMIÈRE

	DÉGAGEMENT O_2 (μ atome)	Pm ESTÉRIFIÉ (μ mole)
Témoin	2,6	2,0 (100)
$3 \cdot 10^{-4}M$	2,7	1,4 (70)
$1,6 \cdot 10^{-3}M$	2,8	1,0 (50)

Milieu réactionnel en μM /3 ml : TRIS-HCl pH 7,5 : 80; $MgCl_2$: 5; $MnCl_2$: 2; ascorbate de sodium : 10; K_2HPO_4 : 5; R 5 P : 1; glutathion : 1; ADP : 2,5; NADP : 2; chloroplastes : C_3S : 0,5 mg de chlorophylle. EAC : 1 ml préparé à partir d'une suspension de C_3S contenant 2 mg de chlorophylle par ml.

Dans ces conditions (tabl. VI-3), nous avons trouvé qu'en présence de pCPEOD, aussi bien à $3.10^{-4}M$ qu'à $1.6.10^{-3}M$, le dégagement d'oxygène et la réduction concomitante (et 'sensiblement stoechiométrique) de NADP ne sont pas affectées. Par contre, la phosphorylation liée au transport d'électrons est inhibée de 30 p. 100 à $3.10^{-4}M$ de pCPEOD et de 50 p. 100 à $1.6.10^{-3}M$. La parachlorophényl-3-éthyl-5-oxazolidine-dione-2.4 agit donc comme un désaccouplant de la phosphorylation liée à la réduction de NADP.

L'expérience du tableau VI-4 est une répétition de l'expérience précédente (système substrat en ADP et NADP) avec la seule différence que la quantité de chlorophylle entraînée avec l'extrait aqueux de chloroplastes (EAC) est plus faible. Cette expérience confirme la précédente.

TABLEAU VI-4

ACTION DE pCPEOD SUR LA RÉDUCTION DE NADP
LA PHOSPHORYLATION COUPLÉE ET LA FIXATION DU CO_2
PAR DES CHLOROPLASTES D'ÉPINARDS, A LA LUMIÈRE

	N° DES FIOLES	NADP RÉDUIT (μ mole)	Pm ESTÉRIFIÉ (μ mole)	CO_2 FIXÉ (cpm / fiole)
Témoin	1	1,9	1,3 (100)	
	2			349 000 (100)
$3.10^{-4}M$	3	2,0	0,7 (54)	
	4			268 000 (76)
$1.6.10^{-3}M$	5	1,5	0,5 (39)	
	6			166 000 (47)

Milieu réactionnel comme tableau VI-3 sauf que dans les fioles 2, 4 et 6 du $Na H^{14} CO_3$ ($10 \mu M$) est ajouté.

Chloroplastes C_1S : 0,5 mg de chlorophylle ; EAC : 1 ml préparé à partir d'une suspension de chloroplastes à 1,14 mg de chlorophylle par ml.

Il n'est donc pas douteux que ce composé agit essentiellement en désaccouplant la phosphorylation liée au transport d'électrons.

Il se comporte donc en cela comme l'ion ammonium et d'ailleurs à des concentrations sensiblement comparables puisque TRESBT, LOSADA et ARNON (103) trouvent un désaccouplement de 18 p. 100 à $5.10^{-5}M$, de 47 p. 100 à $10^{-4}M$ et de 94 p. 100 à $10^{-2}M$.

La question se pose alors de savoir si la pCPEOD inhibe égale-

ment la photophosphorylation cyclique, non liée à la réduction de NADP et au dégagement d'oxygène. On sait que les chloroplastes isolés d'épinards sont susceptibles de fournir de l'ATP par phosphorylation cyclique avec le même rendement que celui que l'on observe *in vivo* (ALLEN, WHATLEY et ARNON (1)).

Nous avons donc mesuré l'estérification de phosphate minéral dans un système cyclique avec PMS, en présence et en absence de pCPEOD. Deux expériences ont été réalisées, l'une avec chloroplastes d'épinards (tabl. VI-5), l'autre avec des chloroplastes de chou de Chine.

TABLEAU VI-5
INHIBITION PAR LA pCPEOD DE LA PHOTOPHOSPHORYLATION CYCLIQUE
CATALYSÉE PAR PMS

CONCENTRATION DE pCPEOD	Pm ESTÉRIFIÉ (μ M/mg de chlorophylle/h)	
	Chloroplastes d'épinards	Chloroplastes de choux de Chine
0	640 (100)	520 (100)
$3 \cdot 10^{-4}$ M	—	430 (83)
$1.7 \cdot 10^{-3}$ M	—	56 (14)
$3,3 \cdot 10^{-3}$ M	140 (22)	—

Milieu réactionnel (μ M dans 3 ml) : Tris pH 8,0 : 80; Mg Cl₂ : 5; ADP : 10; K₂HPO₄ : 10. Chloroplastes : épinards C₁S : 0,15 mg de chlorophylle; choux chinois : 0,05 mg de chlorophylle.

Dans les deux cas, nous trouvons une très forte inhibition : de 80 p. 100 à $3 \cdot 10^{-3}$ M pour la première, de 85 p. 100 pour la seconde à $1.6 \cdot 10^{-3}$ M. *Il n'est donc pas douteux que la pCPEOD est un inhibiteur de la phosphorylation photosynthétique en général.*

3° FIXATION DE CO₂ ET PHOTOPHOSPHORYLATION DANS DEUX RÉACTIONS PARALLÈLES

Dans l'expérience du tableau VI-4, les fioles 2, 4 et 6 contiennent respectivement le même mélange réactionnel que les fioles 1, 3, et 5 avec la seule différence que nous avons ajouté du ¹⁴CO₃HNa.

L'examen des fioles 1 et 2, 3 et 4, 5 et 6 permet donc de comparer fixation du CO_2 et photophosphorylation (formation d'ATP et de NADPH_2) dans des conditions aussi semblables que possible. Le tableau VI-4 montre que l'inhibition de la fixation de CO_2 est parallèle à celle de la formation d'ATP.

4° INFLUENCE DE LA pCPEOD SUR LA NATURE DES PRODUITS DE FIXATION DU CO_2 .

On sait que, d'après le schéma de Calvin (BASSHAM et CALVIN (10)) et d'après les expériences d'ARNON et de ses collaborateurs avec des chloroplastes isolés, l'ATP intervient en deux points : d'une part dans la phosphorylation de Ribulose-5 Phosphate en Ribulose-1,5-di-phosphate, qui est l'accepteur de CO_2 et d'autre part dans la transformation de l'acide-3-phosphoglycérique en acide 1,3-diphosphoglycérique. *Le manque absolu* d'ATP empêche donc et la formation de l'accepteur (RudP) et la régénération du Ribulose-5-phosphate à partir de l'acide 3-phosphoglycérique : aucune fixation n'est possible. *En présence d'une quantité réduite d'ATP* la fixation est limitée par la faible quantité de Ribulose du phosphate qui peut être formée dans ces conditions. Le principal produit de la fixation est l'acide 3-phosphoglycérique : il n'y a pas d'ATP disponible pour le phosphoryler en acide 1,3-diphosphoglycérique et il tend à s'accumuler.

C'est bien ce que nous observons dans nos expériences.

L'analyse chromatographique des surnageants des fioles des expériences du tableau VI-1 montre dans tous les cas une nette accumulation de PGA au fur et à mesure que la concentration de l'inhibiteur augmente. Par exemple, les autoradiogrammes correspondant aux extraits de l'expérience n° 3 (fig. VI-2) mettent clairement en évidence cette accumulation.

A la dose $1.7.10^{-3}\text{M}$, la fixation de CO_2 , qui n'est plus que 38 p. 100 de celle du témoin, ne dépasse pratiquement pas le stade du phosphoglycérate (PGA). La radioactivité mesurée sur les chromatogrammes montre que le PGA ne représente dans le témoin que 10 p. 100 du total des produits fixés, alors qu'à la dose $1.7.10^{-3}\text{M}$ il totalise 85 p. 100 de la fixation totale.

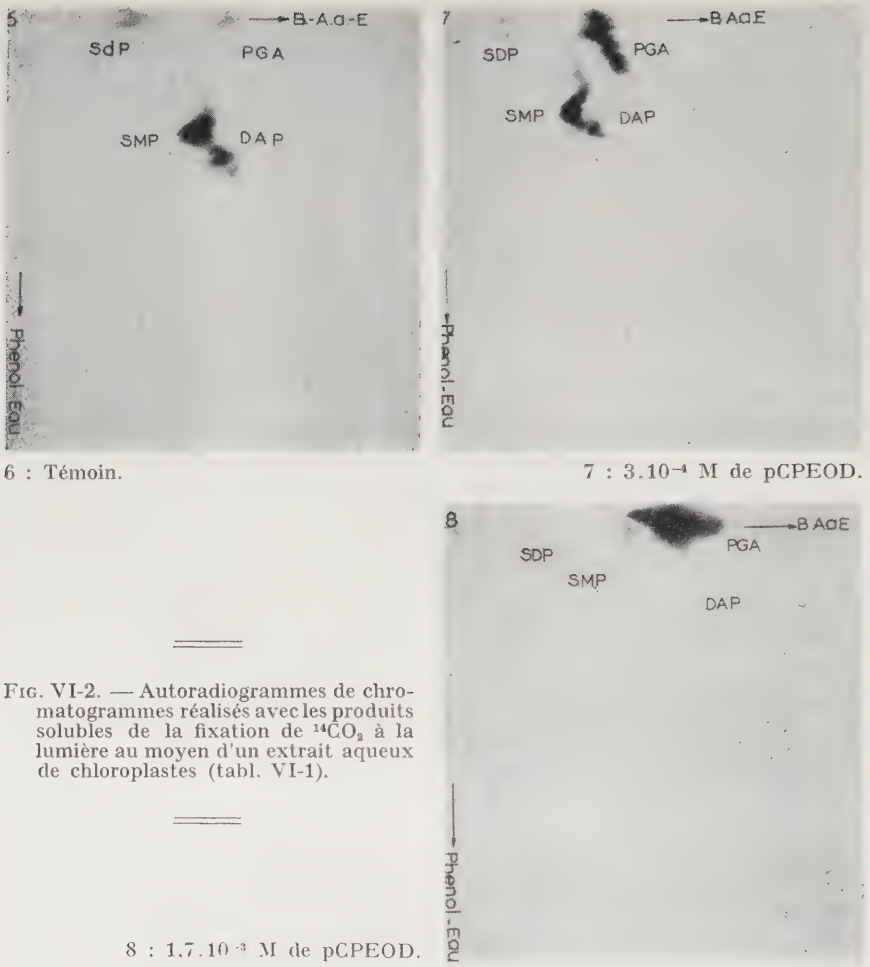


FIG. VI-2. — Autoradiogrammes de chromatogrammes réalisés avec les produits solubles de la fixation de $^{14}\text{CO}_2$ à la lumière au moyen d'un extrait aqueux de chloroplastes (tabl. VI-1).

5° CONCLUSION

Il est donc clair qu'*in vitro* la pCPEOD se comporte comme un agent de désaccouplement de la photophosphorylation et que cette action rend compte de l'inhibition de la fixation de CO_2 que nous avons observée sur des plantes entières traitées. Nous pouvons conclure également de ces expériences, comme nous l'avons précédé-

demment noté, que la molécule de para-chloro-phényl-3-éthyl-5-oxazolidine-dione-2.4 est active en elle-même sans nécessiter de transformation préalable par la plante.

La phosphorylation photosynthétique n'est pas la seule source d'ATP pour les plantes, aussi convient-il de rechercher si les principales autres phosphorylations, celles liées au transport d'électrons de la respiration, sont également sensibles à l'action de la pCPEOD. C'est ce que nous envisageons dans le chapitre suivant.

Chapitre VII

ACTION DE LA PARACHLOROPHÉNYL-3- ÉTHYL-5 OXAZOLIDINE-DIONE-2.4 SUR LES PHOSPHORYLATIONS OXYDATIVES

Pour rechercher si la pCPEOD avait la propriété de désaccoupler les phosphorylations oxydatives, nous avons étudié son action *in vitro* directement sur des mitochondries de foie de rat et indirectement sur des mitochondries extraites de plantules étiolées préalablement traitées.

1^o EXPÉRIENCE RÉALISÉE AVEC DES MITOCHONDRIES DE FOIE DE RAT

Dans une première approche du problème nous avons étudié l'action *in vitro* de la pCPEOD sur les mitochondries isolées de foie de rat. De très nombreuses preuves ont été en effet données de l'identité des propriétés oxydatives et phosphorylantes des mitochondries d'origine animale et végétale (D. P. HACKETT (46)). Nous avons été cependant limités dans cette expérience (1) par le volume maximum d'éthanol, nécessaire pour véhiculer la pCPEOD, tolérable par les mitochondries de foie de rat. La concentration finale en éthanol du mélange réactionnel ne pouvant dépasser 0,5 p. 100 (ROSENBERG, communication personnelle) nous avons dû nous limiter à une concentration molaire d'inhibiteur de $5 \cdot 10^{-4}M$. Une telle concentration devrait cependant être suffisante pour mesurer l'activité d'un désaccouplant énergétique (on sait que le DNP désaccouple à $5 \cdot 10^{-5}M$ *in vitro* (LOOMIS et LIPMANN (60))). Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau VII-1.

A cette dose de $5 \cdot 10^{-4}M$, la pCPEOD n'a aucune action ni sur les phosphorylations, ni sur le transport d'électrons.

Il n'est cependant pas exclu qu'elle agisse à dose plus élevée.

TABLEAU VII-1

ACTION DE LA pCPEOD SUR LE DÉSACCOUPLLEMENT
DES PHOSPHORYLATIONS OXYDATIVES DE MITOCHONDRIES DE FOIE DE RAT
(SUBSTRAT : SUCCINATE)

INHIBITEUR	μAO_2 ABSORBÉS EN 20 MN	μAP ESTÉRIFIÉS	P / O
0	3,27	5,97	1,84
$5 \cdot 10^{-4}\text{M}$	3,00	5,37	1,79

(1) Cette expérience a été réalisée à l'Institut de Biologie physico-chimique dans le Service du P^r ROSENBERG.

Nous avons vu en effet que cet inhibiteur n'a que peu d'action sur les chloroplastes isolés avant la concentration de 10^{-3}M . Par ailleurs le fait qu'il précipite partiellement dans le milieu réactionnel de la fiole de Warbug rend, comme nous l'avons dit plus haut, la connaissance de la concentration réelle efficace impossible.

Dans ces conditions nous ne pouvons pas conclure de cette expérience à une absence totale d'action et nous avons alors expérimenté l'action *in vitro* en essayant de faire respirer et phosphoryler des mitochondries isolés de plantes préalablement traitées, comme l'ont fait par exemple KEY, HANSON et BILIS (55) avec des sojas ayant subi un traitement au 2.4.D.

2° EXPÉRIENCES RÉALISÉES AVEC DES MITOCHONDRIES DE CONCOMBRES

Bien que différents auteurs aient pu isoler des mitochondries de feuilles dans des conditions très satisfaisantes, en obtenant d'excellents rendements respiratoires et phosphorylants (PIERPOINT (82-83)) nous avons préféré nous en tenir, eu égard à la facilité de la technique, à des plantules étiolées. Nous les avons soumises à des traitements avec des doses élevées de pCPEOD, puisque nous savions que ce composé n'avait aucun effet sur la croissance aux doses normales (équivalent à 4 kg/ha en pulvérisation sous un faible volume). Comme nous l'avons indiqué plus haut, nous avons dû abandonner le soja pour ces expériences, en raison des difficultés que nous avons

à obtenir de bons rendements respiratoires et phosphorylants; nous avons utilisé des axes hypocotyles de concombres étiolés, dont la croissance était également inhibée par des traitements à dose élevée de pCPEOD (c'est-à-dire par contact avec un volume important — 5 à 15 ml — d'une émulsion concentrée).

Dans une première expérience, nous avons mis en contact, 24 heures avant la récolte, des plantules de concombres âgées de 4 jours, avec des émulsions titrant respectivement 10^{-4} , 10^{-3} et $2 \cdot 10^{-2}M$ de pCPEOD. Les plantules témoins étaient mises en contact avec une émulsion au Tween sans inhibiteur.

Comme chaque traitement correspond à une extraction de mitochondries différente, il n'est pas possible de comparer les valeurs absolues des absorptions d'oxygène et d'estérification. Nous constatons seulement (tabl. VII-2) que le P/O se maintient à une valeur égale à celle du témoin (1,94) jusqu'à une dose de $10^{-3}M$; au-delà il y a une chute brutale, puisque ce rapport n'est plus que de 0,45 à $2 \cdot 10^{-2}M$. Il n'y a donc désaccouplement que pour des traitements extrêmement sévères.

TABLEAU VII-2
RESPIRATION ET PHOSPHORYLATIONS
DE MITOCHONDRIES D'HYPOCOTYLES ÉTIOLÉS DE CONCOMBRES

(Substrat = succinate)
(Temps de contact : 24 h)

INHIBITEUR	μAO_2 ABSORBÉS EN 25 MN	μAP ESTÉRIFIÉS	P/O
0	2,75	5,40	1,94
$10^{-4}M$	4,18	8,12	1,94
$10^{-3}M$	3,31	6,77	2,04
$2 \cdot 10^{-2}M$	3,07	1,40	0,45

Cependant il est possible qu'il y ait comme dans le cas de l'inhibition de la fixation de $^{14}CO_2$ un temps de latence entre le traitement et la manifestation de l'effet inhibiteur. Aussi avons-nous repris la même expérience avec cette fois-ci un temps de contact de 48 heures. Ce traitement avait provoqué un ralentissement de croissance en poids frais des hypocotyles de 52 p. 100 à la dose

la plus forte et n'avait pas affecté celle des deux autres doses.

On voit que d'une part le traitement paraît sans grand effet, même à dose élevée, sur le transport d'électrons et que d'autre part il semble y avoir une baisse des phosphorylations à la dose 10^{-3}M , qui commence probablement à peine à se manifester puisque la croissance n'en a pas encore été affectée; enfin il y a blocage complet des phosphorylations à la dose forte. Ce blocage ne s'est donc manifesté qu'entre le 1^{er} et le 2^e jour de traitement : il est donc normal que la croissance (mesurée à partir du traitement) n'ait été inhibée que de 50 p. 100.

Il semble donc que le seuil de désaccouplement, dans les conditions de ces expériences, se situe aux environs de 10^{-3}M . Pour préciser ce point, nous avons traité des plantules, toujours dans les mêmes conditions, pendant 24, 48 et 72 heures, avec une émulsion titrant 5.10^{-3}M de pCPEOD.

Dans ce cas nous avons observé une baisse régulière des phosphorylations, qui ne sont cependant pas complètement désaccouplées au bout de trois jours.

3^o DISCUSSION

La pCPEOD est donc susceptible d'agir comme désaccouplant des phosphorylations oxydatives : il est nécessaire pour cela de soumettre les plantules en germination à des traitements qui sont

TABEAU VII-3

RESPIRATION ET PHOSPHORYLATIONS OXYDATIVES
DE MITOCHONDRIES D'HYPOTYLES DE CONCOMBRES

(Substrat = succinate)
(Temps de contact : 48 h)

INHIBITEUR	QO_2N $\mu\text{A} / \text{mgN} / \text{h}$	μAO_2 PRÉLEVÉS EN 20 MN	μAP ESTÉRIFIÉ	P / O
0	290	2,92	4,53	1,55
10^{-4}M	284	2,75	5,22	1,89
10^{-3}M	—	3,34	4,25	1,27
2.10^{-2}M	260	2,38	0	0

beaucoup plus sévères que ceux qui provoquent la mort des plantules vertes. Seul le maintien en contact pendant au moins 24 heures avec des émulsions concentrées d'inhibiteur ($5 \cdot 10^{-3}M$) permet d'observer un ralentissement net de croissance, qui est alors accompagné d'un désaccouplement partiel.

On n'observe d'inhibition totale de la croissance des plantules de concombres qu'après 48 heures de traitement à $2 \cdot 10^{-2}M$. A ce moment-là (tabl. VII-3) les phosphorylations sont totalement désaccouplées. De même à $5 \cdot 10^{-3}M$ on observe une inhibition progressive de la respiration et des phosphorylations qui semble correspondre à la diminution progressive de la croissance des hypocotyles. Si on exprime la croissance en p. 100 de celle du témoin pendant la même période, on trouve un ralentissement de 30 p. 100 le 1^{er} jour, de 60 p. 100 le 2^e et de 78 p. 100 le 3^e.

Il n'est donc pas douteux qu'à condition de traiter avec des doses suffisamment fortes la pCPEOD provoque un désaccouplement des phosphorylations oxydatives, qui rend compte de façon satisfaisante des retards de croissance des germinations.

Il n'est pas douteux non plus qu'aux doses normales de traitement herbicide de plantules vertes cette action ne doit pas intervenir. Nous verrons cependant plus loin que la croissance et le métabolisme azoté de cultures de tissus de topinambours sont légèrement perturbés si l'on ajoute au milieu de culture de la pCPEOD à une concentration de $2 \cdot 10^{-4}M$. Cette action est alors attribuable au désaccouplement partiel des phosphorylations oxydatives.

TABLEAU VII-4

RESPIRATION ET PHOSPHORYLATIONS OXYDATIVES
DE MITOCHONDRIES D'HYCOTYLES DE CONCOMBRES

(Substrat = succinate)
(Dose de traitement : $5 \cdot 10^{-3}M$)

TEMPS DE CONTACT (H)	μAO_2 ABSORBÉS EN 20 MN	μAP ESTÉRIFIÉ	P / O
0	1,75	3,57	2,04
24	2,30	3,76	1,63
48	1,39	0,72	0,52
72	0,95	0,65	0,68

4^o CONCLUSION

Nous concluons donc de ces expériences que la parachlorophényl-3-éthyl-5-oxazolidine-dione-2.4 est susceptible de désaccoupler les phosphorylations oxydatives, mais seulement dans le cas de traitements très sévères et que cette action peut rendre compte de l'inhibition de croissance des plantules en germination ainsi traitées. Cependant elle n'intervient certainement pas, compte tenu des doses employées, dans l'effet herbicide sur les plantules vertes.

On peut donc admettre que le principal mode d'action de la parachlorophényl-3-éthyl-5 oxazolidine dione-2.4 réside dans l'inhibition de la formation d'ATP photosynthétique.

Il nous a paru intéressant d'étudier les répercussions de cette inhibition sur le métabolisme général et en particulier sur le métabolisme glucidique, azoté et sur celui des acides carboxyliques des plantes traitées.

Nous verrons en même temps si les résultats obtenus n'impliquent pas un autre mode d'intervention. Nous avons le plus souvent étudié les trois aspects du métabolisme général sur un même lot de plantes. Cependant pour la clarté de l'exposé nous regrouperons dans trois chapitres différents les résultats relatifs au métabolisme glucidique d'abord, azoté ensuite et finalement à celui des acides carboxyliques.

Chapitre VIII

ACTION DE QUATRE PHÉNYL-3- ALKYL-5-OXAZOLIDINE-DIONE-2.4 SUR LE MÉTABOLISME GLUCIDIQUE DES PLANTES TRAITÉES

Les principaux produits de la fixation photosynthétique du CO_2 étant les sucres solubles et l'amidon, l'inhibition de la formation d'ATP que provoque le traitement avec pCPEOD devrait entraîner une baisse générale de ces métabolites dans les plantes.

Nous avons vu au chapitre V que trois autres phényl-oxazolidine-diones partagent la propriété d'inhiber la fixation de CO_2 *in vivo*. Il nous a paru intéressant de vérifier sur cet aspect du métabolisme, si étroitement lié à la photosynthèse, si les plantes traitées avec ces trois herbicides étaient comparables à celles inhibées par la pCPEOD. Dans deux expériences nous avons donc mesuré la teneur en amidon et en sucres solubles des plantes traitées avec ces quatre oxazolidine-diones. Rappelons qu'il s'agit outre de la pCPEOD (parachlorophényl-3-éthyl-5), de la PMOD (phényl-méthyl) de la mCPMOD (métachlorophényl-méthyl) et de la pCPMOD (parachlorophénylméthyl). Nous verrons également si d'autres expériences réalisées avec la pCPEOD confirment les résultats ainsi obtenus.

1^o COMPARAISON DES QUATRE PHÉNYL-OXAZOLIDINE-DIONES-2.4

Dans une première expérience nous avons mesuré la teneur en amidon des parties aériennes de tomates, 5 jours après qu'elles aient été traitées avec pCPEOD (4 kg/ha), mCPMOD (8 kg/ha), PMOD et pCPMOD (16 kg/ha), c'est-à-dire à des doses provoquant une inhibition complète de la croissance en poids sec. Au moment

du traitement les plantes étaient âgées de 16 jours. Les teneurs trouvées sont alors les suivantes (tabl. VIII-1) :

TABLEAU VIII-1
TENEUR EN AMIDON (% m.s.) DES PARTIES AÉRIENNES DE TOMATES
(Exp. n° VIII A)

TÉMOIN	PMOD	mCPMOD	pCPMOD	pCPEOD
4,13 (100)	0,70 (17)	1,27 (31)	0,91 (22)	1,57 (38)

Nous voyons que les 4 traitements provoquent une baisse très sensible des quantités d'amidon : 83 p. 100 pour PMOD, 69 p. 100 pour mCPMOD, 78 p. 100 pour pCPMOD et 62 p. 100 pour pCPEOD. Ces résultats sont comparables à ceux que nous avons obtenus pour la fixation de CO_2 : à ces mêmes doses, ces 4 herbicides avaient provoqué sur des plantes de soja une inhibition de 50 à 65 p. 100 de la fixation.

Une deuxième expérience nous a permis de confirmer ces résultats. Des tomates âgées de 34 jours ont été traitées avec les mêmes composés, aux mêmes doses. La récolte était faite 9 jours après le traitement, au lieu de 5 dans l'expérience précédente. Les résultats (tabl. VIII-2) montrent que les teneurs sont encore plus faibles pour la pCPMOD et la pCPEOD que dans l'expérience précédente, alors que le traitement avec la mCPMOD provoque une baisse du même ordre de grandeur.

TABLEAU VIII-2
TENEUR EN AMIDON (% m.s.) DES PARTIES AÉRIENNES DE TOMATES
(Exp. n° VIII-B)

TÉMOIN	PMOD (16 kg/ha)	mCPMOD (8)	pCPMOD (16)	pCPEOD (4)
3,99 (100)	—	1,74 (44)	0,44 (11)	0,37 (9)

Il y a donc une baisse progressive pour pCPMOD et pCPEOD, des teneurs en amidon. Neuf jours après le traitement, les réserves amylacées sont presque complètement épuisées.

Les teneurs en sucres solubles (*) des parties aériennes et des racines des plantes sont consignées dans le tableau VIII-3. (Les valeurs correspondant aux traitements PMOD et mCPMOD manquent dans cette expérience.)

TABLEAU VIII-3
TENEUR EN SUCRES SOLUBLES (mg/g de m.s.)
DES PARTIES AÉRIENNES ET DES RACINES DE TOMATES
(Exp. n° VIII-B)

		GLUCOSE	FRUCTOSE	SACCHA-ROSE	TOTAL
T	Parties aériennes . .	1,40	1,45	0,20	3,05
	Racines	0,73	0,66	0,23	1,62
	Moyenne pondérée . .	1,00	0,98	0,22	2,20
pCPMOD	Parties aériennes . .	0,48	0,46	0,19	1,13
	Racines	0,51	0,86	0,17	1,54
	Moyenne pondérée . .	0,49	0,62	0,19	1,30
pCPEOD	Parties aériennes . .	0,34	0,30	0,17	0,81
	Racines	0,45	0,40	0,12	0,97
	Moyenne pondérée . .	0,39	0,34	0,15	0,88

Ces résultats montrent que les deux traitements provoquent une baisse très sensible des teneurs en sucres solubles des parties aériennes. Cette baisse est due essentiellement au Fructose et au Glucose, le Saccharose restant presque constant.

Les racines des plantes traitées avec la pCPMOD ont des teneurs sensiblement identiques à celle du témoin, de sorte que les sucres solubles totaux de la plante ont diminué de 40 p. 100. Les racines des plantes traitées avec la pCPEOD ne contiennent plus qu'une quantité réduite des 3 sucres et finalement la teneur de cette plante est inférieure de 60 p. 100 à celle des plantes témoins.

Il y a donc baisse très sensible des sucres solubles comme de l'amidon. Dans le cas du traitement pCPEOD, on peut penser que cette diminution résulte du manque d'ATP qu'il provoque chez les plantes traitées. Le parallélisme étroit entre les résultats obtenus

(*) REMARQUE. — La technique d'extraction de la fraction neutre, par passage de l'extrait soluble sur Permutite 50, entraîne une hydrolyse partielle du saccharose (le pH de l'éluat étant fortement acide). Les valeurs individuelles des teneurs en saccharose, glucose et fructose sont donc douteuses. Cependant leur total reste bien représentatif de l'ensemble de la fraction « sucres solubles » : il permet donc de juger valablement l'évolution de cette fraction.

avec la pCPEOD et la pCPMOD, tant sur la fixation de CO_2 que sur la teneur en amidon, et en sucres solubles incite à attribuer également à la pCPMOD la propriété inhibitrice des phosphorylations photosynthétiques. On peut également envisager que cette propriété soit partagée par la PMOD et la mCPMOD puisqu'elles sont toutes deux inhibitrices de la fixation de CO_2 et de la formation d'amidon. Il semble donc bien que l'inhibition de la phosphorylation photosynthétique soit une propriété commune aux 4-phényloxazolidine-diones étudiées. Cependant les seuils d'activité *in vivo* sont très variables de l'une à l'autre et la pCPEOD est sans conteste la plus active, puisque l'inhibition de la croissance, de la fixation de CO_2 , de la formation d'amidon est obtenue à une dose de 4 kilogrammes par hectare, alors qu'il faut 8 kilogrammes de mCPMOD et 16 kilogrammes des deux autres dérivés pour obtenir des effets sensiblement identiques.

Nous nous limiterons donc désormais à l'étude des effets de la parachloro-phényl-3-éthyl-5-oxazolidine-dione-2.4 sur le métabolisme, en formulant l'hypothèse qui nous paraît raisonnable, que les résultats obtenus sont extrapolables aux trois autres dérivés, sous réserve de leurs seuils d'activité.

2° ACTION DE LA pCPEOD SUR LE MÉTABOLISME GLUCIDIQUE

Nous venons de voir que le traitement des plants de tomates avec la pCPEOD à 4 kilogrammes par hectare provoquait une baisse de la teneur en amidon de 62 p. 100 après 5¹ jours (exp. VIII-A) de 90 p. 100 après 9 jours (exp. VIII-B) et qu'après ce délai les sucres solubles totaux de la plante avaient diminué de 60 p. 100.

Il semble qu'il y ait baisse progressive de la teneur en amidon. Pour confirmer ce point de vue, nous avons traité des plants de sojas à des intervalles échelonnés, en effectuant les pulvérisations 4, 6 et 8 jours avant la récolte. La pCPEOD était appliquée dans les 3 cas à la même dose : 4 kilogrammes par hectare. Nous avons observé dans ce cas (tabl. VIII-4) qu'il y a bien eu diminution régulière, puisque l'amidon a baissé de 50 p. 100 par rapport au témoin le 4^e jour, de 80 p. 100 le 6^e et de 92 p. 100 le 8^e.

TABLEAU VIII-4
TENEUR EN AMIDON (% m.s.)
DES PARTIES AÉRIENNES DE SOJAS TRAITÉS AVEC pCPEOD
(Exp. n° VIII-C)

TÉMOIN	NOMBRE DE JOURS ENTRE LE TRAITEMENT ET LA RÉCOLTE		
	4	6	8
1,09 (100)	0,55 (51)	0,21 (19)	0,09 (8)

Nous avons en outre mesuré parallèlement la teneur en amidon et en sucres solubles sur les plantes d'une même expérience.

Dans un premier cas (exp. n° VIII-D) des plantules de sojas âgées de 20 jours environ ont été traitées avec la pCPEOD à 4 kilogrammes par hectare. Quatre jours plus tard, les plantes témoins et les plantes traitées ont été récoltées en constituant 2 lots pour chaque traitement : l'un était broyé après séchage au four à 80 °C, l'autre après fixation dans l'azote liquide, la poudre congelée étant alors mise en présence d'eau acidulée par addition de Permutite 50, comme indiqué plus haut (Matériel et Méthodes). Les mesures des teneurs en amidon étaient effectuées sur le premier lot, les dosages de sucres solubles sur le deuxième. Les résultats (tabl. VIII-5) montrent

TABLEAU VIII-5
TENEUR EN AMIDON ET EN SUCRES SOLUBLES (mg/g de m.s.)
DES PARTIES AÉRIENNES DE SOJAS TRAITÉES AVEC LA pCPEOD
(Exp. VIII-D)

	AMIDON	SUCRES SOLUBLES (*)			
		Glucose	Fructose	Saccharose	Total(*)
Témoin	22,3 (100)	2,2	5,0	4,5	11,7
Plantes traitées . .	12,8 (57)	2,5	5,6	4,2	12,3

(*) D'autres sucres que le fructose, le glucose et le saccharose sont présents dans ces extraits, mais en quantité beaucoup plus faible. Nous n'en avons pas tenu compte.

que le traitement n'a pas eu d'influence sur les sucres solubles, alors que la teneur en amidon a baissé de 43 p. 100.

Une autre expérience (n° VIII-E) a été réalisée avec des tomates, avec un protocole identique. Dans ce cas (tabl. VIII-6) il y a eu une baisse très importante de la teneur en amidon (83 %) et une diminution déjà sensible des sucres solubles (32 %) portant essentiellement sur le glucose et le fructose.

TABLEAU VIII-6

TENEUR EN AMIDON ET EN SUCRES SOLUBLES (mg/g de m.s.)
DES PARTIES AÉRIENNES DE TOMATES TRAITÉES AVEC LA pCPEOD
(Exp. VIII-E)

	AMIDON	SUCRES SOLUBLES			
		Glucose	Fructose	Saccharose	Total
Témoin	49,7 (100)	6,8 (100)	6,5 (100)	1,6 (100)	14,9 (100)
Plantes traitées. . .	8,5 (17)	4,7 (69)	4,0 (62)	1,5 (91)	10,2 (68)

Il n'y a donc de diminution appréciable des sucres solubles que pour un épuisement déjà avancé des réserves amylacées, ce qui est le cas des expériences n° VIII-B (diminution de 90 % pour l'amidon, de 60 % pour les sucres solubles) et n° VIII-E (83 % pour l'amidon, 32 % pour les sucres solubles). Tant que ce seuil n'est pas atteint les teneurs en sucres solubles restent constantes (exp. n° VIII-D : baisse de l'amidon : 43 %, sucres solubles inchangés).

3° DISCUSSION - CONCLUSION

On peut donc conclure de ces expériences que le traitement des plantes avec la pCPEOD provoque une diminution très rapide de la teneur en amidon et, dès que cette teneur devient très basse par rapport au témoin, une baisse sensible (40 à 60 %) de celle des sucres solubles. Ces résultats s'expliquent aisément avec l'hypothèse d'une inhibition de la phosphorylation photosynthétique : on sait

depuis les travaux de HANES (47) que la phosphorylase catalyse la transformation de l'amidon en glucose-1-phosphate en présence d'ions phosphates, et que le sens de la réaction est déterminé par le rapport entre les ions phosphates minéraux et le glucose-1-phosphate. Il est bien connu en outre que cette enzyme est distribuée d'une façon très générale dans les tissus végétaux (HANES (48)). Le traitement avec la pCPEOD provoquant une inhibition de la formation d'ATP, la formation d'hexoses phosphates est très fortement freinée (c'est ce que nous avons vu avec des extraits de chloroplastes); la concentration en glucose-phosphate diminuant et la quantité de Phosphate minéral non estérifié restant constante ou même augmentant, la phosphorylase catalyse la réaction dans le sens de la dégradation de l'amidon.

Les molécules de glucose ainsi libérées doivent être utilisées au même rythme par la glycolyse et la respiration puisque nous ne trouvons pas d'accumulation de sucres solubles. Le niveau de ces sucres reste donc constant, aux dépens de l'amidon antérieurement formé, jusqu'à ce que, ce dernier étant pratiquement épuisé, la glycolyse provoque une diminution progressive des sucres solubles. Il est probable que l'action du traitement se prolongeant, il doit y avoir épuisement complet des sucres solubles.

Nous retiendrons en outre que les 3 autres phényl-oxazolidinediones expérimentées provoquent elles aussi, sous réserve d'être appliquées à des doses convenables, une baisse très importante des teneurs en amidon et qu'elles doivent donc partager la même propriété que la pCPEOD d'inhiber la phosphorylation photosynthétique.

Chapitre IX

INFLUENCE DE LA PARACHLORO-PHÉNYL-3 ÉTHYL-5-OXAZOLIDINE-DIONE-2.4 SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ DE PLANTES TRAITÉES ET DE CULTURES DE TISSUS DE TOPINAMBOURS

Nous examinerons maintenant les répercussions sur le métabolisme azoté du traitement avec la pCPEOD.

Pour cela nous avons étudié l'influence de cet herbicide sur le métabolisme azoté de plantes entières d'une part et de cultures de tissus de topinambours d'autre part. Il nous a paru en effet important de nous assurer que la pCPEOD n'avait pas d'action directe au niveau de la synthèse des protéines et du métabolisme général de l'azote, c'est-à-dire que les perturbations provoquées par le traitement sur des plantes entières n'étaient que des conséquences de l'inhibition des photophosphorylations. Le choix du Topinambour nous a été dicté par le fait que lors de la mise en culture des fragments de parenchyme de ce tubercule, il se produit un remaniement très important de la fraction aminée soluble : l'arginine, qui représente dans le tubercule au repos — entre novembre et mai — 70 p. 100 de l'azote aminé libre du tubercule (3 mg/g de poids frais) disparaît très rapidement pour faire place à des quantités importantes de Proline, d'Hydroxy-Proline, d'acide glutamique, d'amides et d'alanine (DURANTON (39)). Ces transformations se produisent relativement lentement (en quelques jours). Elles constituent donc un phénomène intéressant pour l'étude de l'inhibition éventuelle des transaminations et de la synthèse des protéines. Comme d'autre part ces cultures forment peu de chlorophylle et que leur nutrition carbonée se fait essentiellement à partir du glucose du milieu de culture, les troubles du métabolisme azoté que l'on pourrait observer sous l'action de la pCPEOD seraient indépendants de son pouvoir inhibiteur des photophosphorylations.

Nous examinerons donc successivement l'influence de la pCPEOD sur le métabolisme azoté de plantes entières et sur celui de cultures de tissus de Topinambours.

1^o INFLUENCE DE LA pCPEOD SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ DES PLANTES

A. — *Résultats de l'expérience IX A :*

Une première expérience (IX-A) a été réalisée avec des tomates : les plantes, âgées de 40 jours au moment du traitement, ont été traitées par pulvérisation de pCPEOD à la dose de 4 kilogrammes par hectare. La récolte a été effectuée 6 jours plus tard. Les plantes témoins et traitées ont été divisées en 2 lots, l'un séché à 80°, l'autre fixé dans l'azote liquide et subissant une extraction à l'eau acidulée comme indiqué précédemment. La récolte des plantes le jour du traitement nous ayant permis de connaître le poids par pied à cette date, la récolte 6 jours après traitement nous a montré que la pCPEOD avait inhibé complètement la croissance en poids sec.

a) *Bilan azoté.* — Sur les lots des plantes séchées à 80 °C et broyées, nous avons mesuré l'azote total et l'azote nitrique. Les lots ayant subi une extraction à l'eau acidulée nous ont permis de doser les acides aminés solubles et constitutifs des protéines. Nous examinerons successivement quel est le bilan azoté des plantes témoins et des plantes traitées, à partir d'une part des valeurs de l'azote total et d'autre part de l'azote protéique et aminé soluble, calculé à partir des données des dosages chromatographiques, et enfin de l'azote nitrique. Le bilan ainsi établi (tabl. IX-1) montre que le traitement n'entraîne pas de modifications fondamentales : l'azote protéique reste inchangé, l'azote aminé soluble augmente de façon relativement importante (200 %) mais comme les valeurs absolues sont très faibles, cette augmentation n'a que très peu d'influence sur le bilan général; la seule action sensible se situe au niveau de l'azote nitrique, qui diminue de façon importante. Finalement l'azote total est plus faible chez les plantes traitées, et cette baisse est entièrement due à la disparition des nitrates.

TABLEAU IX-1

BALANCE DE L'AZOTE (en % de la m.s.)
DANS DES PARTIES AÉRIENNES DE TOMATES TÉMOINS ET TRAITÉES AVEC pCPEOD
(Exp. n° IX-A)

	N INS. (1)(*)	N SOLUBLE			N TOTAL	
		(2)(**) nitrique	(3)(*) aminé	(2)+(3) (***) total	(1)+(2) +(3) (***)	(4)(**) mesuré
Témoin	2,45	0,98	0,06	1,04	3,49	3,58
Plantes traitées	2,44	0,55	0,17	0,72	3,16	3,14

(*) Valeur calculée à partir des dosages chromatographiques.

(**) Dosage direct.

(***) Valeur calculée à partir des autres données.

Il ne semble pas que l'on puisse attribuer la teneur plus faible en nitrates des plantes traitées à une réduction plus active. En effet l'azote aminé total (soluble + insoluble) est dans ce cas égal à 2,61 contre 2,51 pour les plantes témoins.

b) *Évolution des différentes formes d'azote entre le traitement et la récolte.* — L'interprétation de ces résultats est plus évidente si nous représentons le bilan azoté en fonction de la croissance. En supposant que la composition des plantes témoins n'a pas changé entre le traitement et la récolte (soit en 6 j) nous pouvons comparer l'évolution de chaque fraction pendant cette période. Connaissant le poids sec par pied au traitement et à la récolte, nous pouvons calculer en milligrammes par pied la quantité d'azote correspondant

TABLEAU IX-2

ÉVOLUTION DES QUANTITÉS D'AZOTE DE CHAQUE FRACTION
ENTRE LE TRAITEMENT ET LA RÉCOLTE (en mg/pied)
(parties aériennes de tomates) (Exp. n° IX-A)

	N TOTAL	N INS.	N AM. SOL.	N NITRIQUE
Témoin	+ 7,19	+ 5,04	+ 0,13	+ 2,02
Plantes traitées.	— 0,34	— 0,13	+ 0,05	— 0,27

à chaque fraction et mesurer leur évolution par différence entre les valeurs à la récolte et le jour du traitement. Les résultats ainsi présentés (tabl. IX-2) montrent que le traitement a provoqué une inhibition complète de la protéosynthèse et même un début de protéolyse: une partie des nitrates initialement présents a disparu. La seule fraction en augmentation est celle des acides aminés solubles, il s'en forme cependant moins que dans les plantes témoins.

c) *Composition de la fraction aminée soluble et des protéines.* — Si nous examinons maintenant la composition de la fraction aminée soluble et celle des protéines (tabl. IX-3) nous voyons que celle des protéines est restée remarquablement constante malgré le traitement, à deux exceptions près : l'histidine a diminué et la phénylalanine

TABLEAU IX-3
COMPOSITION DE LA FRACTION AMINÉE SOLUBLE
ET DES PROTÉINES DES PLANTES TÉMOINS ET TRAITÉES (en mg/g de m.s.)
(parties aériennes de tomates) (Exp. IX-A)

	TÉMOIN		pCPEOD	
	a. a. sol.	a. a. ins.	a. a. sol.	a. a. ins.
Glycine	0,11	7,85	0,28	8,55
Alanine	0,77	10,62	1,11	8,82
Valine	—	12,17	0,67	10,10
Leucine	—	52,64	0,67	62,21
γ Am. butyrique	0,55	—	4,72	—
Sérine	0,44	8,74	0,61	9,43
Thréonine	0,33	8,85	0,39	7,16
A. aspartique	0,66	17,36	1,39	17,93
A. glutamique	1,66	20,90	4,22	18,59
Arginine	—	13,16	—	15,10
Lysine	—	9,62	—	9,77
Asparagine	—	—	—	—
Glutamine	0,22	—	—	—
Cystéine	—	—	—	—
Ornithine	—	—	—	—
Histidine	—	5,97	—	—
Proline	0,55	—	—	—
Tyrosine	+	8,07	—	3,55
Phénylalanine	—	—	—	5,27
TOTAL	5,29	175,95	14,06	176,18

+ acide aminé présent mais non dosable.
 + + acide aminé présent en quantité importante mais non dosé (asparagine).
 — absent ou non dosé.

se trouve en quantité notable dans les plantes traitées alors qu'elle était absente des protéines des plantes témoins. Cependant la phénylalanine étant très mal séparée, en chromatographie bidimensionnelle sur papier, de la leucine, cette augmentation nous paraît incertaine. En ce qui concerne l'histidine nous ne voyons aucune explication à cette différence. De toute façon ces variations n'affectent que très peu la composition des fractions.

Il n'en va pas de même de la fraction aminée soluble, qui varie très sensiblement sous l'effet du traitement. Presque tous les acides aminés se retrouvent en quantité plus importante, sauf la Proline; ceux pour lesquels l'augmentation est la plus forte sont l'acide γ -aminobutyrique et l'acide glutamique. On note également, bien qu'elles n'aient pu être dosées, une très sensible augmentation de l'asparagine et de l'arginine; cependant la glutamine a diminué.

Avant de tirer des conclusions de ces résultats, nous examinerons dans quelle mesure ils sont confirmés par les autres expériences. Nous en citerons deux, réalisées toutes deux avec des tomates. Nous avons négligé dans ces expériences la composition des protéines, les résultats précédents montrant nettement que le traitement est pratiquement sans action dans ce domaine.

B. — *Résultats de l'expérience IX-B*

L'expérience suivante (IX-B) a été réalisée sur un protocole identique à celui de la précédente. Les seules différences portent sur l'âge des tomates au traitement (60 j) et la durée de l'essai (4 j entre le traitement et la récolte). Il s'agit en fait de l'expérience VIII-E, dont nous avons vu au chapitre précédent les résultats concernant le métabolisme glucidique (baisse de 83 % de la teneur en amidon, de 32 % des sucres solubles). Comme dans l'expérience précédente, le traitement a provoqué un arrêt complet de la croissance en poids sec et même une perte de matière sèche (poids sec par pied le jour du traitement : 520 mg; le jour de la récolte : témoins : 592; plantes traitées : 496).

a) *Bilan azoté*. — Le bilan azoté des plantes à la récolte s'établit comme suit (tabl. IX-4).

TABLEAU IX-4
BILAN AZOTÉ (N % de la m.s.) DE PARTIES AÉRIENNES DE TOMATES
TRAITÉES OU NON AVEC pCPEOD
(Exp. n° IX-B)

	N INS. (1)(**)	N SOL.			N TOTAL		
		(2)(**) nitrique	(3)(*) aminé	(4)(**) total	calculé (***) (1)+(2) + (3)	calculé (***) (1)+(4)	mesuré (**)
Témoin	2,36	0,52	0,10	0,75	2,98	3,11	3,11
Plantes traitées	2,27	0,67	0,18	0,98	3,12	3,25	3,25

(*) Calculé d'après les valeurs des dosages chromatographiques.

(**) Mesuré directement.

(***) Calculé à partir des autres données.

Dans cette expérience, l'azote insoluble et l'azote soluble total ont été mesurés directement, en effectuant une extraction à l'éthanol 50 p. 100 sur une quantité connue des matières sèches broyées et en dosant par Kjeldahl l'azote des fractions solubles et insolubles ainsi séparées. Nous avons également vérifié par la méthode de Yovanovitch appliquée à ces fractions solubles, qu'il n'y avait pas d'ammoniaque soluble.

On voit qu'il y a une bonne concordance entre les différentes séries de mesures.

Comme dans l'expérience précédente, le traitement n'entraîne pas de variation sensible de l'azote insoluble. Par contre il ne provoque pas de diminution de la teneur en nitrates. L'azote aminé soluble tend également à augmenter et finalement l'azote total varie très peu.

b) *Évolution des différentes formes d'azote.* — Si nous représentons les résultats en mesurant l'évolution de chaque fraction en milligrammes par pied entre le traitement et la récolte, nous voyons (tabl. IX-5) que le traitement provoque comme dans l'expérience précédente, non seulement un arrêt de la synthèse des protéines, mais également une hydrolyse d'une partie des protéines initialement présentes, de l'ordre de 8 p. 100. L'azote aminé soluble augmente très sensiblement plus que dans le témoin, ainsi que l'azote nitrique. L'augmentation de ces deux fractions compense totalement la

TABLEAU IX-5
ÉVOLUTION DE LA QUANTITÉ D'AZOTE DE CHAQUE FRACTION
ENTRE LE TRAITEMENT ET LA RÉCOLTE (en mg /pied)
(parties aériennes de tomates) (Exp. n° IX-B)

	N TOTAL (*)	N INS. (*)	N AM. SOL. (**)	N NITRI- QUE (**)
Témoin	+ 2,24	+ 1,70	+ 0,07	+ 0,38
Plantes traitées.	— 0,05	— 1,01	+ 0,41	+ 0,62

(*) Valeurs calculées à partir des mesures d'azote par Kjeldahl.

(**) Valeurs calculées à partir des dosages directs ou des résultats de dosages chromatographiques.

baisse de l'Azote Protéique; l'azote total reste donc au niveau où il était le jour du traitement.

c) *Composition de la fraction aminée soluble.* — La question se pose de savoir quelle est la nature exacte des acides aminés libres

TABLEAU IX-6
COMPOSITION DE LA FRACTION AMINÉE SOLUBLE DE PARTIES AÉRIENNES DE TOMATES
TRAITÉES OU NON AVEC LA pCPEOD (en mg/g de m.s.)
(Exp. n° IX-B)

	TÉMOIN	pCPEOD
Glycine.	0,20	0,17
Alanine.	0,28	0,29
Valine	0,18	0,23
Leucine.	0,30	0,41
γ Am. butyrique	0,73	1,89
Sérine	0,41	0,74
Thréonine.	0,13	0,25
Ac. aspartique	2,10	1,26
Ac. glutamique	0,62	2,10
Arginine	0,52	—
Lysine	0,27	0,33
Asparagine	+	—
Glutamine	0,45	4,78
Cystéine	+	—
Proline	+	—
Histidine	0,39	—
Tyrosine	0,27	0,16
TOTAL	6,85	12,61

— acide aminé absent.

+ acide aminé présent mais non dosable.

++ acide aminé présent en quantité notable mais non dosé.

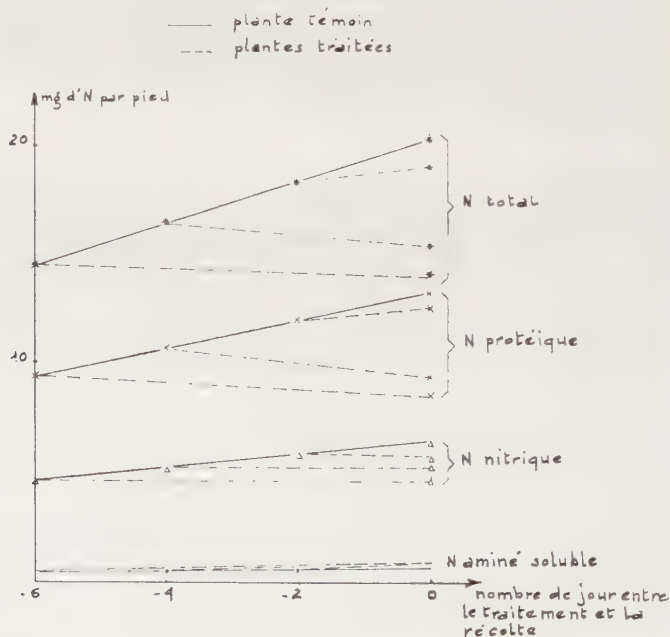
apparus sous l'influence du traitement? La composition de la fraction aminée soluble (tabl. IX-6) montre que l'augmentation de cette fraction est due essentiellement à l'accumulation de deux acides : γ -aminobutyrique, glutamique et d'une amide : la glutamine.

L'examen des chromatogrammes montre d'ailleurs que l'asparagine augmente également d'une façon notable. Pour les autres acides, la composition varie assez peu. La presque totalité des gains d'azote de la fraction aminée soluble est due à la glutamine.

C. — Résultats de l'expérience IX-C

Une troisième expérience (IX-C) a été réalisée dans le but de suivre l'évolution des fractions azotées en fonction du temps s'écoulant après le traitement. Utilisant toujours des tomates, nous avons effectué des traitements sur des lots différents, 2, 4 et 6 jours avant

GRAPHIQUE IX 1 — Evolution des différentes fractions azotées en fonction du temps après traitement (ex sc)



la récolte. Dans tous les cas le traitement consistait comme précédemment en une pulvérisation d'émulsion correspondant à une dose de 4 kilogrammes par hectare. Les plantes étaient âgées de 30 jours à la récolte. Ces 3 pulvérisations ont provoqué un arrêt pratiquement total de la croissance.

a) *Évolution des différentes formes d'azote.* — Nous examinons directement l'évolution des différentes fractions azotées en fonction du temps, en milligrammes d'azote par pied. Nous avons représenté graphiquement cette évolution dans le graphique IX-1 et calculé dans le tableau IX-7 les gains ou pertes de chaque fraction pendant le temps qu'a duré le traitement.

TABLEAU IX-7

ÉVOLUTION DES DIFFÉRENTES FRACTIONS AZOTÉES (en mg/pied)
ENTRE LE TRAITEMENT ET LA RÉCOLTE, POUR DES PARTIES AÉRIENNES DE TOMATES
TRAITÉES AVEC LA pCPEOD
(Exp. n° IX-C)

		N TOTAL (1)	N NITRIQUE (2)	N AM. SOL. (3)	N AM. INS. (4)
2 jours.	T	+ 1,90	+ 0,61	+ 0,05	+ 1,24
	pCPEOD	+ 0,66	— 0,19	+ 0,32	+ 0,53
4 jours.	T	+ 3,81	+ 1,21	+ 0,11	+ 2,49
	pCPEOD	— 1,05	+ 0,05	+ 0,31	— 1,41
6 jours.	T	+ 5,71	+ 1,82	+ 0,16	+ 3,73
	pCPEOD	— 0,51	+ 0,05	+ 0,40	— 0,96

Ces résultats mettent en évidence les points suivants :

— 2 jours après le traitement, la synthèse des protéines a été très fortement ralentie (de 60 % environ), l'azote aminé soluble a augmenté très sensiblement et une partie de l'azote nitrique (faible d'ailleurs) a disparu;

— 4 jours après le traitement, il y a eu une hydrolyse assez sensible des protéines (14 % environ) et apparition d'acides aminés libres, dans les mêmes proportions que précédemment. Les nitrates sont restés à leur niveau de départ.

— 6 jours après la pulvérisation de pCPEOD, on observe encore une hydrolyse des protéines, de l'ordre de 10 p. 100 et une

accumulation d'acides aminés libres, toujours du même ordre de grandeur. Les nitrates là encore sont stationnaires.

b) *Composition de la fraction aminée soluble.* — L'analyse chromatographique montre que l'augmentation de la fraction aminée soluble est due essentiellement à l'accumulation d'acide γ -aminobutyrique, d'acide glutamique, d'arginine et de glutamine (tabl. IX-8)

TABLEAU IX-8
COMPOSITION DE LA FRACTION AMINÉE SOLUBLE DE PARTIES AÉRIENNES DE TOMATES
TRAITÉES OU NON AVEC pCPEOD (mg/g de m.s.)
(Exp. n° IX-C)

	TÉMOIN	APRÈS 2 JOURS	APRÈS 4 JOURS	APRÈS 6 JOURS
Glycine	0,12	0,12	0,11	0,11
Alanine	0,85	0,82	0,95	1,09
Valine	0,24	0,23	0,24	0,33
Leucine	0,36	0,47	0,48	0,43
γ aminobut.	0,61	1,05	1,17	1,09
Sérine	0,48	0,93	0,85	0,87
Thréonine	0,24	0,65	0,42	0,33
Ac. aspartique	2,06	2,45	2,76	3,26
Ac. glutamique	2,43	4,90	4,98	4,68
Arginine	0,48	1,28	1,17	1,30
Lysine	×	×	✓	✓
Asparagine	+	+ +	+ +	+ +
Glutamine	1,21	1,98	2,54	2,18
Cystéine	+	+	+	+
Proline	0,48	0,35	0,85	1,30
Tyrosine	+	+	+	+
TOTAL	9,56	15,23	16,52	16,97

D. — Discussion

a) *Comparaison des résultats des trois expériences.* — Ces 3 expériences nous ont finalement donné les résultats suivants, que nous représenterons de façon schématique pour plus de clarté :

Expérience n° IX-A (récolte 6 j après le traitement) :

- azote protéique : pas de protéosynthèse; protéolyse faible;
- azote aminé soluble : accumulation sensible par rapport à la matière sèche; accumulation inférieure à celle du témoin dans l'évolution par pied;

— azote aminé total : sensiblement stationnaire entre le traitement et la récolte;

— azote nitrique : en baisse par rapport au niveau initial;

— azote total : en baisse par rapport au niveau initial.

Expérience n° IX-B (récolte 5 j après le traitement) :

— azote protéique : protéolyse sensible (8 %);

— azote aminé soluble : accumulation importante par rapport à la matière sèche et dans l'évolution par pied : il apparaît 6 fois plus d'acides aminés libres que dans le témoin (essentiellement glutamine, acide glutamique et γ -aminobutyrique);

— azote total : en baisse sensible depuis le traitement (5 %);

— azote nitrique : il apparaît 2 fois plus d'azote nitrique que dans le témoin;

— azote total : stationnaire entre le traitement et la récolte.

Expérience n° IX-C (récolte 2, 4 et 6 j après le traitement) :

En 2 jours :

— azote protéique : inhibition de 60 p. 100 de la synthèse nette;

— azote aminé soluble : il apparaît 6 fois plus d'azote aminé soluble que dans le témoin (+ 0,05 mg de N par pied pour le témoin; + 0,32 pour les plantes traitées); la teneur sur matière sèche augmente sensiblement surtout par l'acide glutamique, l'argine et la glutamine;

— azote aminé total : il en apparaît 30 p. 100 de moins que dans le témoin;

— azote nitrique : une partie des nitrates initialement présents a disparu (3 %);

— azote total : en augmentation, mais plus faible que pour le témoin.

En 4 jours :

— azote protéique : protéolyse sensible (14 %);

— azote aminé soluble : accumulation nette; comme précédemment la quantité d'acides aminés solubles par gramme de matière sèche est sensiblement la même qu'après 2 jours pour les plantes traitées; la différence d'accumulation par rapport au témoin n'est plus que de 1 à 3, au lieu de 1 à 6;

- azote aminé total : en baisse sensible (10 %);
- azote nitrique : stationnaire entre le traitement et la récolte;
- azote total : en baisse.

En 6 jours :

- azote protéique : protéolyse sensible (10 %);
- azote aminé soluble : la composition de la fraction est identique à celle des plantes après 2 jours et 4 jours de traitement; la différence d'accumulation par rapport au témoin est de 1 à 3;
- azote aminé total : baisse sensible (5 %);
- azote nitrique : stationnaire entre le traitement et la récolte;
- azote total : en baisse.

b) *Action du traitement sur la synthèse des Protéines.* — Un premier point — essentiel — ressort clairement de ces 3 expériences : *après 48 heures le traitement entraîne une inhibition sensible de la synthèse nette des protéines et au delà de 4 jours il y a inhibition complète, avec disparition d'une partie des protéines initialement présentes.* C'est l'effet le plus net provoqué par le traitement. Il s'explique parfaitement par l'inhibition de la formation d'ATP photosynthétique, puisqu'il a été clairement démontré que la première étape de la synthèse des peptides consiste dans une activation des acides aminés par l'ATP (HOAGLAND (51), KINGDOM (56), BELJANSKI (11)). La protéolyse concomitante que nous observons 4 jours après le traitement est également tout à fait cohérente avec les données classiques de la physiologie foliaire, puisque après les travaux de MOTHES (76), GREGORY et SEN (45), VICKERY et collaborateurs (104), on sait que la protéogenèse et la protéolyse se déroulent simultanément : l'inhibition de la protéosynthèse entraîne donc la manifestation de la protéolyse, jusque-là masquée chez des plantes en croissance, ce qui est le cas de celles que nous avons utilisées. Comme la composition des protéines des plantes traitées est très sensiblement la même que celle des témoins, il ne semble pas que la pCPEOD intervienne directement au niveau de la protéosynthèse et que l'inhibition résulte seulement du déficit d'ATP.

c) *Action du traitement sur les acides aminés libres.* — En ce qui concerne la fraction aminée soluble il apparaît qu'elle augmente

dans tous les cas entre le traitement et la récolte, que l'on rapporte la teneur en acides aminés à la matière sèche totale ou qu'on l'exprime par plante. Sauf dans le cas de l'expérience n° IX-A, il apparaît beaucoup plus d'acides aminés libres qu'il n'en apparaît pendant le même temps chez le témoin.

Le comportement différent des plantes de l'expérience IX-A provient de ce que le témoin avait eu une croissance très active pendant la période considérée, nettement supérieure à celle des plantes non traitées des 2 autres expériences. Dans tous les cas après 4 jours l'accumulation d'azote aminé libre est inférieure à la perte d'azote protéique. Il est extrêmement probable que ces acides libres proviennent de la protéolyse, suivant un processus analogue à celui qui se produit dans les feuilles excisées. Ce point de vue nous paraît confirmé par le fait que dans les 3 cas il y a formation importante d'amides (glutamine-asparagine), qui sont des formes d'accumulation de l'ammoniaque libéré par la désamination oxydative des acides aminés (VICKERY et coll., CHIBNALL, cités par BONNER (19) et MOYSE (77-78).) Il est intéressant de noter que cette accumulation d'acides aminés libres avec apparition de quantités importantes d'amides, se manifeste dans l'expérience n° IX-B dès le 2^e jour, alors qu'il y a quand même eu synthèse nette de protéine. Il y a donc bien eu, conformément aux données classiques, protéolyse concomitante, accompagnée en outre d'une désamination oxydative des acides aminés chez les plantes traitées.

Il est également important de souligner que nous n'avons jamais trouvé de guanidines dans aucun des extraits analysés, comme on en observe dans les tissus de type tumoraux (MOREL (67)).

d) *Action du traitement sur l'azote nitrique.* — Le sort des nitrates nous paraît difficile à déterminer clairement. Notons tout d'abord que la présence de nitrates en quantité importante dans les tissus aériens n'est pas surprenante : on sait depuis la revue de BURSTROM sur la nutrition nitrique des plantes (23) que la Tomate effectue la réduction des nitrates aussi bien dans les feuilles que dans les racines. On sait par ailleurs que le taux de nitrates présents dans les tissus est fonction de plusieurs facteurs, dont la rapidité de l'absorption et le taux de réduction, celui-ci dépendant de la lumière (COMBES

(31), BONNER (18)). Il n'est donc pas aisé d'interpréter les résultats de nos expériences dans ce domaine, d'autant qu'ils sont différents d'une expérience à l'autre. Nous pouvons seulement noter qu'il ne semble pas que le manque d'ATP provoqué par le traitement avec la CPEOD doive influencer directement le fonctionnement de la nitrate réductase; celui-ci en effet ne nécessite que la présence de NADPH_2 et de transporteurs d'électrons tels que la flavine-adénine-dinucléotide (NASON, cité par BURRIS (22)).

E. — *Conclusion*

Les troubles essentiels du métabolisme azoté des plantes entières nous paraissent donc résulter directement du manque d'ATP photosynthétique, provoqué par le traitement. Pour nous en assurer définitivement, il convient de pouvoir s'adresser à des tissus non chlorophylliens présentant un métabolisme azoté actif : les cultures de tissus de Topinambours nous ont paru constituer un matériel de choix pour cette recherche, comme nous l'avons indiqué plus haut.

2° INFLUENCE DE LA pCPEOD SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ DE CULTURES DE TISSUS DE TOPINAMBOURS

A. — *Réalisation de l'expérience*

Nous avons ensemencé des fragments de tubercule de Topinambour suivant les méthodes très classiques de GAUTHERET (42) et dans les conditions indiquées par DURANTON (39). La pCPEOD était additionnée au milieu à une dose correspondant à une concentration finale de $2 \cdot 10^{-4}\text{M}$, mise en solution avec un volume suffisant d'éthanol (concentration finale 2 %). Dans ces conditions la pCPEOD n'a pas précipité au contact de la gélose. Les tubes témoins recevaient le même volume d'éthanol. La récolte a été effectuée 13 jours après la mise en culture, et les tissus ont été fixés et traités comme pour les expériences avec les plantes entières.

B. — Résultats

La fraction aminée soluble a alors la composition ci-contre : (tabl. IX-9). A titre de comparaison nous donnons parallèlement les valeurs trouvées par DURANTON à la mise en culture puis 2, 6 et 20 jours après.

Les résultats obtenus par DURANTON montrent que dans les 6 premiers jours, la mise en culture se traduit par une disparition presque complète de l'arginine, alors que la proline, l'hydroxyproline, les acides glutamique, aspartique et les amides s'accu-

TABLEAU IX-9

A : composition de la fraction aminée soluble 13 jours après la mise en culture (avec et sans traitement pCPEOD)

B : composition de la fraction aminée soluble aux temps 0, + 2, + 6 et + 20 jours (d'après Duranton) (mg/g P.F.)

	A		B			
	Témoin (+ 13 j)	pCPEOD 2.10 ⁻⁴ M (+ 13 j)	0	+ 2 j	+ 6 j	+ 20 j
Glycine	0,02	0,05	0,02	0,02	+	0,02
Alanine	0,16	0,50	0,03	0,21	0,64	0,06
Valine	0,04	0,10	×	0,09	0,06	—
Leucine + isoleucine	0,06	0,15	0,09	0,06	0,12	—
γ am. butyrique . .	0,05	0,08	×	×	—	—
Thréonine	0,05	0,09	0,06	0,12	0,11	0,02
Ac. aspartique . . .	0,10	0,43	+	0,20	0,20	0,09
Ac. glutamique . . .	0,72	2,89	0,17	0,63	0,56	0,19
Arginine	0,36	0,98	1,51	1,04	0,10	0,15
Asparagine	+	+				
Glutamine	0,25	0,61	0,33	1,08	1,25	0,16
Serine	0,04	0,08				
Proline	0,31	1,00	×	0,33	1,29	0,02
Hydroxy-Proline . .	+	+		0,15	1,65	×
Phénylalanine . . .	×	+	0,07	0,13	0,10	—
Tyrosine	×	0,04	0,06	0,05	0,19	—
Histidine	×	×	0,06	0,06	0,05	—
Lysine	×	×	0,07	×	0,02	—
TOTAL	2,18	7,00	2,50	4,17	6,43	0,70

× absent.

+ présent mais non dosé.

mulent. Par la suite on observe une baisse générale de tous les acides libres.

La composition de la fraction aminée soluble des cultures témoins de notre expérience est très comparable à celle citée par DURANTON : la récolte ayant été effectuée 13 jours après la mise en culture, nous observons bien la présence de proline, d'acides glutamique et aspartique; ces acides sont déjà en quantité réduite, correspondant à la phase d'incorporation dans les protéines (6^e au 20^e j). La teneur en arginine est faible. Les cultures en présence de la pCPEOD ont une composition voisine de celles âgées de 2 à 6 jours : la teneur en arginine a déjà beaucoup baissé et les autres acides aminés sont en quantité importante, notamment l'acide glutamique, l'acide aspartique et la proline. *Leur formation à partir de l'arginine s'est déroulée normalement: il n'y a donc pas eu d'inhibition des transaminations.* Il est manifeste par contre que le stade suivant est fortement inhibé. Or cette période, du 6^e au 20^e jour, correspond à une croissance active des explantats, donc à une synthèse active de protéines. L'incorporation de ces acides aminés libres dans les protéines serait donc inhibée par la pCPEOD.

C. — Discussion

Cette inhibition ne nous paraît pas impliquer une intervention directe au niveau de la protéosynthèse. En effet la fourniture d'ATP — nécessaire à l'activation des acides aminés dans la première étape de la synthèse des peptides — est assurée pour ces cultures par les phosphorylations oxydatives. Or nous avons vu que le seuil d'inhibition de ces phosphorylations pour des germinations en contact permanent avec une émulsion de pCPEOD était de $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$. Il nous semble probable que ce seuil puisse être très sensiblement plus bas dans le cas d'un parenchyme mis directement en contact avec l'inhibiteur. La concentration de pCPEOD dans cette expérience étant de $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$, l'inhibition des phosphorylations oxydatives a pu intervenir.

3° CONCLUSIONS GÉNÉRALES CONCERNANT L'ACTION DE LA pCPEOD SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ

Nous retiendrons donc de cette expérience que la pCPEOD est sans action sur les transaminations. L'inhibition de l'incorporation des acides aminés libres dans les protéines nous paraît résulter du déficit d'ATP dû au désaccouplement probable des phosphorylations oxydatives.

L'action de la parachlorophényl-3-éthyl-5-oxazolidine-dione-2.4 sur le métabolisme azoté des plantes est donc essentiellement une inhibition de la synthèse des protéines, qui apparaît comme une conséquence normale de l'inhibition des phosphorylations photosynthétiques.

Chapitre X

ACTION DE LA PARACHLOROPHÉNYL-3 ÉTHYL-5-OXAZOLIDINE-DIONE-2.4 SUR LES ACIDES ORGANIQUES DES PLANTES TRAITÉES

Après avoir étudié l'influence sur le métabolisme glucidique et azoté de la pCPEOD, nous examinerons celle qu'elle peut avoir sur les acides organiques des plantes traitées. Nous rapporterons les résultats de 4 expériences : les 3 premières, réalisées avec des tomates, sont celles que nous avons étudiées dans le chapitre précédent; nous les désignerons par X-A, X-B et X-C. La dernière, X-D, a été réalisée avec des sojas : nous avons noté au chapitre VIII les résultats de cette même expérience en ce qui concernait les sucres solubles et l'amidon (exp. VIII-D). Nous n'avons pas indiqué les résultats donnés par l'analyse des fractions azotées de ces plantes, pour ne pas surcharger la présentation du chapitre correspondant : nous noterons seulement au passage qu'ils confirment ceux obtenus avec les tomates.

Dans chacune de ces expériences, la fraction acide était éluee de la résine échangeuse d'anions par le carbonate d'ammonium. L'éluat était concentré à sec sous vide dans un évaporateur rotatif et repris par l'eau. L'extrait ainsi obtenu était chromatographié sur colonne de silice comme indiqué précédemment.

1^o RÉSULTATS

A. — Dans la première expérience (A), l'acidité organique des plantes, 6 jours après le traitement était la suivante : témoins, 1,12 mEq /g de m. s.; plantes traitées 3,30, soit une augmentation très importante. Si nous calculons l'évolution par pied de cette acidité organique en fonction de la croissance, nous trouvons pour les témoins comme pour les plantes traitées un gain net d'acidité

de 0,166 mEq/pied. Les teneurs exprimées en fonction de la matière sèche rendent donc moins compte d'une augmentation de la formation d'acides organiques sous l'effet du traitement que d'une baisse des autres fractions présentes dans la matière sèche. Il n'en est pas moins intéressant de noter que les acides organiques constituent dans cette expérience la seule fraction dont l'évolution n'est pas inhibée par le traitement. Il reste cependant à voir si la composition de cette fraction acide est semblable à celle des plantes témoins; les résultats des dosages (tabl. X-1) montrent qu'il y a eu formation importante des acides malique et citrique, les seuls présents d'ailleurs en quantité notable dans le témoin. L'accumulation est surtout importante pour l'acide citrique dont l'augmentation représente 70 p. 100 de l'augmentation totale.

TABLEAU X-1
COMPOSITION EN ACIDES ORGANIQUES DE PARTIES AÉRIENNES DE TOMATES
TRAITÉES OU NON AVEC pCPEOD (mEq/g de m.s.)
(Exp. n° X-A)

	ACIDE SUCCINIQUE	ACIDE MALIQUE	ACIDE CITRIQUE	TOTAL
Témoins	—	0,90	0,21	1,12
Plantes traitées.	+	1,58	1,72	3,30

B. — L'expérience B (récolte 4j après le traitement) nous a donné les résultats suivants (tabl. X-2 et X-3).

TABLEAU X-2
BILAN ET ÉVOLUTION DE L'ACIDITÉ ORGANIQUE DE PARTIES AÉRIENNES DE TOMATES
TRAITÉES OU NON AVEC pCPEOD
(Exp. n° X-B)

	ACIDE ORGANIQUE (mEq/g de m. s.)	ÉVOLUTION DE L'ACIDE ORGANIQUE ENTRE LE TRAITE- MENT ET LA RÉCOLTE (mEq/pied)
Témoins	1,15	+ 0,083
Plantes traitées.	1,36	+ 0,076

TABLEAU X-3

COMPOSITION EN ACIDES ORGANIQUES DE PARTIES AÉRIENNES DE TOMATES
TRAITÉES OU NON AVEC pCPEOD (mEq /g de m.s.)
(Exp. n° X-B)

	FUMA- RIQUE	PYRU- VIQUE	SUCCI- NIQUE	OSA- LIQUE	MALI- QUE	CITRI- QUE	TOTAL
Témoins . . .	0,002	+	0,004	0,002	0,73	0,41	1,15
Plantes traitées	0,02	0,01	0,005	0,01	0,67	0,65	1,36

++ : acide présent mais non dosable.

On voit que la teneur en acides organiques (par rapport à la matière sèche totale) n'a pas augmenté de façon aussi importante que dans l'expérience précédente. Cependant le calcul de l'évolution par pied montre que comme précédemment la formation d'acides organiques est restée équivalente à celle des plantes témoins (en acidité totale). Nous avons vu dans les deux chapitres précédents que le traitement avait provoqué sur les plantes de cette expérience une hydrolyse importante de l'amidon (83 %) et des sucres solubles (32 %) et une protéolyse déjà sensible (8 %). Il est donc intéressant de noter que la formation d'acides organiques n'est pas inhibée. La composition des fractions montre toutefois que presque tout le gain d'acidité entre le traitement et la récolte est dû à l'acide citrique. Les acides présents en quantité faible augmentent eux aussi sensiblement (sauf l'acide succinique) mais ils n'interviennent que pour une part très minime; l'acide malique reste lui sensiblement inchangé.

C. — La troisième expérience (C) comparait la composition des plantes 2, 4 et 6 jours après le traitement. Elle nous a donné les résultats suivants (tabl. X-4 et X-5),

L'acidité totale, par rapport à la matière sèche, a diminué dans les 2 premiers jours, elle a atteint à nouveau la valeur de départ après 4 jours, pour augmenter sensiblement après 6 jours. L'évolution par pied montre qu'il y a eu perte d'acides organiques dans les 2 jours suivant le traitement, puis formation d'acides nouveaux, à un rythme supérieur à celui du témoin puisque du 2^e au 4^e jour et du 4^e au 6^e jour les plantes témoins en ont formé chaque fois

45 μEq , alors que les plantes traitées en formaient 80, puis 156 μEq . Il semble donc qu'il y ait une évolution très particulière de ces acides organiques.

TABLEAU X-4
ACIDITÉ ORGANIQUE DE PARTIES AÉRIENNES DE TOMATES
TRAITÉES OU NON AVEC pCPEOD
(Exp. n° X-C)

	ACIDITÉ ORGANIQUE (mEq/g de m. s.)
Témoin	1,12
pCPEOD 2 jours	0,77(*)
pCPEOD 4 jours	1,15
pCPEOD 6 jours	1,45

(*) Valeur recalculée, l'extrait n'ayant pu être chromatographié, à partir de l'acidité totale et de la teneur en nitrates.

TABLEAU X-5
ÉVOLUTION DE L'ACIDITÉ ORGANIQUE
DES PLANTES TÉMOINS ET TRAITÉES (mEq/pied)
(parties aériennes de tomates)
(Exp. n° X-C)

2 jours	Témoin	+ 0,045
	Traitée	- 0,096(*)
4 jours	Témoin	+ 0,090
	Traitée	- 0,017
6 jours	Témoin	+ 0,134
	Traitée	+ 0,139

(*) Valeur recalculée.

L'analyse de la composition des fractions acides (tabl. X-6) montre que dans cette expérience l'acide malique et l'acide citrique interviennent respectivement pour 68 et 32 p. 100 dans les plantes témoins comme dans les plantes traitées, alors que dans les deux expériences précédentes l'acide citrique était le principal acide qui s'accumulait dans les plantes traitées.

Il est intéressant de mettre en parallèle dans cette expérience, l'évolution des acides organiques et des différentes formes d'azote.

TABLEAU X-6

COMPOSITION EN ACIDES ORGANIQUES DES PLANTES DE L'EXPÉRIENCE X-C
(mEq/g de m.s.) (parties aériennes de tomates)

	FUMA- RIQUE	SUCCI- NIQUE	OSA- LIQUE	MALIQUE	CITRIQUE	TOTAL
Témoin	+	0,006	0,038	0,816	0,260	1,12
pCPEOD 4 jours .	+	0,005	0,019	0,857	0,270	1,15
pCPEOD 6 jours.	+	0,003	0,036	1,009	0,400	1,45

+ présent mais non dosable.

Nous ne disposons pas des résultats correspondants pour les fractions glucidiques, mais nous avons vu au chapitre VIII que dans tous les cas une grande quantité d'amidon avait disparu (60 à 80 %) dès le 4^e jour suivant le traitement. L'analyse des fractions azotées nous a montré qu'une protéolyse sensible s'était manifestée entre le 2^e et le 4^e jour, mais que le 2^e jour il n'y avait eu qu'une inhibition partielle, quoique importante, de la protéosynthèse. Il semble donc que l'accumulation rapide d'acides organiques dans les plantes traitées entre le 2^e et le 6^e jour soit liée au début de la protéolyse et à la dégradation de l'amidon.

D. — Une dernière expérience (X-D) nous confirmera cette formation d'acides organiques chez les plantes traitées. Elle a été réalisée, comme indiqué plus haut, avec des sojas, traités 4 jours avant la récolte. L'expérience VIII-D nous a montré que le traite-

TABLEAU X-7

BILAN ET ÉVOLUTION DE L'ACIDITÉ ORGANIQUE DE PARTIES AÉRIENNES DE SOJAS
(Exp. X-D)

	ACIDITÉ TOTALE (mEq/g de m.s.)	ÉVOLUTION DE L'ACIDITÉ ORGANIQUE ENTRE LE TRAITEMENT ET LA RÉCOLTE (mEq/pied)
Témoin	0,760	+ 0,030
Traités	1,420	+ 0,061

TABEAU X-8

COMPOSITION EN ACIDES ORGANIQUES DES PARTIES AÉRIENNES DE SOJAS DE L'EXP. X-D
(mEq/g de m.s.)

	FUMA- RIQUE	SUCCI- NIQUE	MALO- NIQUE	OSA- LIQUE	MALI- QUE	CITRI- QUE	TOTAL
Témoin	0,030	0,033	0,066	0,132	0,207	0,292	0,760
Traités.	0,117	0,024	0,207	0,122	0,166	0,784	1,420

ment avait provoqué sur ces mêmes sojas une baisse des teneurs en amidon de 43 p. 100.

L'analyse de la fraction acide (tabl. X-7 et X-8) montre que les plantes traitées accumulent nettement plus d'acides que les plantes témoins (environ 2 fois plus) et leur acidité totale par gramme de matière sèche est 2 fois plus élevée. Cette accumulation est due pour 75 p. 100 à l'acide citrique. L'acide malique tend au contraire à baisser légèrement.

2° DISCUSSION

Nous voyons donc que les plantes de ces 4 expériences tendent à accumuler des acides organiques en quantité au moins égale à celle formée par le témoin. Dans 3 cas sur 4 le principal acide formé est l'acide citrique. Il semble donc bien qu'il y ait là un phénomène assez général se produisant sous l'effet du traitement.

Quelle peut être l'origine de ces acides organiques? Il nous est difficile de répondre à cette question : les acides organiques se trouvent au carrefour d'un grand nombre de métabolismes particuliers des plantes; leur variation peut donc résulter de perturbations très diverses.

Il est clair cependant que la cause de l'apparition de ces acides est différente pour les plantes traitées et les plantes témoins. En effet pour ces dernières la formation d'acides organiques est en liaison avec la réduction des nitrates : l'activité de la nitrate réductase crée un déficit anionique qui n'est pas nécessairement compensé par l'absorption de nouveaux anions minéraux. La formation d'acides

organiques fournit les anions organiques nécessaires au maintien de la balance acido-basique (CLARK (28); CHOUTEAU (27)). Nous vérifions ce fait dans les 3 expériences A, B et C, car en calculant d'une part l'azote organisé (azote aminé total) entre le traitement et la récolte, et d'autre part l'azote nitrique apparu et les acides organiques formés, nous trouvons que la somme des anions apparus compense le déficit causé par l'activité de la nitratre réductase (tabl. X-9). L'ion nitratre est en effet chez la tomate le principal anion absorbé (Coic et coll., 29).

TABLEAU X-9
BALANCE ANIONIQUE DES PARTIES AÉRIENNES DES TOMATES NON TRAITÉES
DE TROIS EXPÉRIENCES
(mEq /pied entre la date du traitement et la récolte)

	AZOTE NITRIQUE APPARU	ACIDITÉ ORGANIQUE FORMÉE	TOTAL	AZOTE NITRIQUE RÉDUIT (*)
Expérience A (6 j) . . .	+ 0,144	+ 0,166	+ 0,310	— 0,360
Expérience B (4 j). . .	+ 0,027	+ 0,083	+ 0,110	— 0,127
Expérience C (6 j). . .	+ 0,129	+ 0,135	+ 0,264	— 0,277

(*) Azote aminé soluble et insoluble formé pendant la période considérée.

Cette cause d'apparition des acides organiques dans les plantes traitées est évidemment exclue puisque le traitement provoque toujours après 4 jours une perte d'azote aminé total. Dans le seul cas où il y a quand même gain net d'acides aminés libres et de protéines (exp. C récolte 2 jours après le traitement) on observe une disparition importante d'acides organiques.

Il n'est pas douteux d'après les résultats de l'expérience X-C que l'apparition de ces acides est liée à la disparition de l'amidon et à l'hydrolyse des protéines. Les résultats des autres expériences vont également dans le même sens. Des variations comparables de la fraction acides organiques en relation avec un état d'épuisement des réserves foliaires ont été obtenus par WOOD et collaborateurs (109, 110, 34) : ces auteurs étudiant l'évolution des acides organiques des feuilles de différentes graminées observent après excision une nette

augmentation de cette fraction au fur et à mesure de l'épuisement des réserves, particulièrement importante pour les acides citrique et malique. Des expériences du même type réalisées avec des feuilles de tabac montrent un remplacement progressif de l'acide malique par l'acide citrique, l'acidité totale restant inchangée (PUCHER et VICKERY, 85). Cependant, ces mêmes auteurs trouvent avec la rhubarbe une baisse de l'acidité totale aussi bien que des acides malique et citrique. Il ne s'agit donc pas là d'un phénomène absolument général lié à l'état d'inanition.

Quoi qu'il en soit, si dans nos expériences, l'apparition des acides organiques semble nettement en relation avec les phénomènes d'hydrolyse provoqués par le traitement, le mécanisme de leur formation nous est totalement inconnu. La fixation sombre de CO_2 par β -carboxylation du pyruvate, du phosphoenol pyruvate ou d'autres substrats pourrait peut-être en rendre compte. On sait en effet que la fixation sombre de CO_2 est un phénomène très général et qu'elle a été démontrée non seulement chez les plantes succulentes (BONNER et BONNER (17), THURLOW et BONNER (97)), mais également chez des plantes ne possédant pas ce type de métabolisme (GIBBS (43), SEN et LEOPOLD (89)).

Ce type de fixation par des plantes non succulentes à l'obscurité se déroule avec un rendement particulièrement faible par rapport à la fixation photosynthétique de CO_2 sur le ribulose diphosphate. Nous l'avons vérifié dans le cas des sojas et des tomates utilisés dans nos expériences en mettant en contact des plantes pendant 9 heures, la nuit, avec $^{14}\text{CO}_2$, dans des conditions identiques, lumière exceptée, à celle des expériences réalisées pour mesurer la fixation photosynthétique. Des plantes traitées 2, 4 et 6 jours auparavant avec 4 kilogrammes par hectare de pCPEOD étaient comparées à des plantes témoins. Les résultats (tabl. X-10) montrent que la fixation par les plantes témoins est considérablement plus faible qu'à la lumière. En effet elle ne dépasse pas 10 000 cpm par gramme de m.s. par heure, alors qu'à la lumière les sojas avaient fixé 3 815 000 cpm par gramme de m.s. par heure, soit 400 fois plus environ (chap. V, tabl. V-6).

Il semble donc douteux qu'une fixation aussi faible puisse rendre compte de la formation d'une quantité non négligeable

TABLEAU X-10
FIXATION A L'OBSCURITÉ DE $^{14}\text{CO}_2$ PAR DES TOMATES ET DES SOJAS
TRAITÉS OU NON AVEC pCPEOD (cpm /g m.s. /h)

	TOMATES	SOJAS
Témoin	9 900	11 500
pCPEOD 2 jours .	10 800	7 000
pCPEOD 4 jours .	10 500	11 000
pCPEOD 6 jours .	3 700	14 400

d'acides organiques. Toutefois il a été démontré par VISHNIAC et OCHOA (105), que la β -carboxylation du pyruvate par l'enzyme malique pouvait se dérouler en présence de grana de chloroplastes et de NADP, à la lumière. Les grana et les cofacteurs nécessaires au déroulement du transport d'électrons interviennent uniquement pour réduire NADP. NADPH₂ est en effet nécessaire à la réalisation de la deuxième réaction catalysée par l'enzyme malique, la réduction d'oxaloacétate en malate. De plus TOLMACH (99, 100) puis ARNON (3) ont mis en évidence que l'activité de l'enzyme malique en présence de grana était beaucoup plus intense à la lumière qu'à l'obscurité.

Il n'est donc finalement pas exclu que les acides organiques accumulés par les plantes traitées avec pCPEOD prennent naissance par β -carboxylation puisque notre expérience montre que la fixation sombre de $^{14}\text{CO}_2$ n'est que peu inhibée par le traitement et même dans certains cas renforcée. Il s'agit là en fait d'une simple hypothèse, dont nous pensons expérimenter la validité dans des expériences ultérieures.

3° CONCLUSION

Finalement l'action de la parachlorophényl-3-éthyl-5-oxazolidine-dione-2.4 sur le métabolisme des plantes traitées se manifeste par 3 phénomènes essentiels :

- une baisse des teneurs en amidon, qui se manifeste rapidement, suivie d'une baisse des sucres solubles;
- un arrêt de la protéosynthèse, presque complet après

48 heures; la protéolyse devient prédominante dès le 4^e jour. Il s'en suit une accumulation d'acides aminés libres, accompagnée d'une desamination oxydative; l'ammoniaque libérée est reprise sous forme d'amides;

— une formation rapide, à partir du 2^e jour, d'acides carboxyliques, et en particulier d'acide citrique. Il s'en forme toujours au moins autant que chez les plantes témoins pendant le même temps et quelquefois sensiblement plus.

Chapitre XI

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

1^o MODE D'ACTION DE LA PARACHLOROPHÉNYL-3-ÉTHYL-5-OXAZOLIDINE-DIONE-2.4

a) *Désaccouplement des photophosphorylations et inhibition de la fixation de CO₂*

L'examen des propriétés inhibitrices de la pCPEOD nous a montré que son action se situe principalement au niveau des phosphorylations photosynthétiques, qu'elle désaccouple. Nous avons utilisé pour cette recherche les schémas expérimentaux d'ARNON et de ses collaborateurs et en interprétant nos résultats en fonction du cycle de CALVIN, nous avons négligé implicitement les critiques faites par certains auteurs (KANDLER (54), STILLER (91)) au cycle proposé par CALVIN et aux expériences réalisées avec des « systèmes reconstitués ».

D'après KANDLER le fonctionnement des chloroplastes isolés *in vitro* n'est pas identique à celui des chloroplastes *in situ*. Ces derniers phosphoryleraient le ribulose-5-phosphate en ribulose-1,5-diphosphate, sans passer par l'intermédiaire d'ATP et réduiraient directement l'acide cétonique formé par carboxylation du RuDP, sans passer par l'intermédiaire du phosphoglycérate, en hexose phosphate. La théorie de KANDLER n'a cependant pas encore reçu de vérifications expérimentales directes. Par ailleurs STILLER (91), s'appuyant sur une série de résultats d'ordre enzymologique, obtenus en particulier par PETERKOWSKY et RACKER, RICHTER, GIBBS et KANDLER, etc... a proposé récemment un schéma modifiant le cycle de CALVIN en deux points essentiels : la fixation de CO₂ ne produirait pas seulement du PGA à partir de ribulose-1,5-di-phosphate, mais également « de novo » et avec intervention directe de la lumière,

un corps en C_2 qui pourrait être l'acide glycolique; c'est ce composé en C_2 et le glycéraldéhyde-3-phosphate provenant de la réduction du PGA qui se condenseraient pour donner le ribulose-5-phosphate. Dans ces conditions toute la phase de régénération du cycle de CALVIN est court-circuitée, et la formation d'hexoses-phosphates est réalisée par des réactions latérales.

Cette théorie est sensiblement différente de celle de KANDLER, d'autant plus qu'elle fait intervenir le pouvoir phosphorylant sous forme d'ATP. STILLER place d'ailleurs les sites d'action de l'ATP aux mêmes emplacements que CALVIN. Comme KANDLER, cet auteur émet l'hypothèse que les « systèmes reconstitués » d'ARNON n'ont plus l'intégrité des réactions photosynthétiques : pour elle il s'agirait de la faculté de fixer directement CO_2 , avec l'intervention de la lumière, sous forme d'acide glycolique ou d'un composé très voisin.

La perte de cette faculté expliquerait que le rendement de fixation de CO_2 des « systèmes reconstitués » soit de 75 à 80 p. 100 inférieur à ceux des cellules entières ou des feuilles d'origine placées dans les mêmes conditions (alors que les phosphorylations photosynthétiques réalisées *in vitro* avec des chloroplastes éclatés d'épinards, atteignent des rendements aussi élevés que ceux calculés à partir des mesures de fixation de CO_2 *in vivo*) (ALLEN, WHATLEY, ARNON (1)).

Le schéma de STILLER faisant intervenir le pouvoir phosphorylant sous forme d'ATP et aux mêmes sites que CALVIN, l'interprétation de l'effet désaccouplant de la pCPEOD dans un tel système ne serait pas fondamentalement modifiée par rapport à celle que nous avons donnée.

Quoi qu'il en soit, ces hypothèses, celle de KANDLER comme celle de STILLER, sont encore trop récentes pour avoir pu donner lieu à l'élaboration d'un système aussi cohérent que celui proposé par CALVIN et ARNON. C'est donc avec les schémas expérimentaux qui ont permis d'élaborer l'ensemble de la théorie de ces deux auteurs que nous avons travaillé et c'est dans ce cadre que nous interprétons nos résultats.

On n'est encore renseigné que d'une façon assez imprécise sur la nature exacte des phosphorylations photosynthétiques concourant

in vivo à la formation d'ATP. On admet généralement qu'elles se déroulent suivant des processus identiques à ceux observés *in vitro*. On aurait ainsi essentiellement deux types de phosphorylations :

— une phosphorylation couplée au transport d'électrons assurant la réduction de NADP (ARNON, WHATLEY, ALLEN (6, 7)).

— une phosphorylation couplée à un transport cyclique d'électrons catalysé soit par FMN ou Vit K (ARNON et ses collaborateurs (8), WHATLEY, ALLEN, ARNON (108)), soit par la Ferredoxine (TAGAWA, TSUJIMOTO, ARNON (93)). Ces 3 cofacteurs sont des constituants normaux des chloroplastes.

L'existence d'une phosphorylation cyclique *in vivo* a été démontrée par FORTI (41). Il a utilisé l'herbicide CMU qui inhibe le dégagement d'oxygène, et donc le transport d'électrons non cyclique et la phosphorylation qui lui est couplée. Ce composé inhibe également les phosphorylations du type pseudo-cyclique, dans lesquelles le cofacteur réduit est réoxydé par l'oxygène produit au cours de la réaction du HILL. En sa présence, ne peut se dérouler qu'une phosphorylation cyclique vraie, indépendante du dégagement d'oxygène. Or cet auteur a montré que des feuilles traitées avec le CMU forment quand même une quantité importante d'ATP à la lumière. Cet ATP s'accumule puisqu'en absence de NADPH_2 le cycle de CALVIN est bloqué au stade du glycérate 1.3 diphosphate.

Nos expériences montrent que la pCPEOD agit aussi bien comme désaccouplant de la phosphorylation liée à la réduction de NADP que comme inhibiteur de la phosphorylation cyclique. Nous avons en effet trouvé d'une part un désaccouplement important dans une réaction de HILL avec NADP comme substrat, d'autre part une forte inhibition dans le cas d'une phosphorylation cyclique catalysée par PMS et enfin une forte inhibition de la fixation de CO_2 malgré la présence de FMN comme cofacteur cyclique. Nous pouvons donc bien considérer la pCPEOD comme un inhibiteur et un désaccouplant des phosphorylations photosynthétiques *in vivo*.

b) *Importance relative du désaccouplement des phosphorylations photosynthétiques et oxydatives*

Le désaccouplement des phosphorylations photosynthétiques nous paraît être le processus essentiel dans le mode d'action de la pCPEOD. Il ne nous semble pas que le désaccouplement des phosphorylations oxydatives puisse intervenir dans l'action herbicide, aux doses pratiques d'emploi. En effet les seuils d'inhibition de la croissance de plantules vertes à la lumière ou en germination à l'obscurité, sont très différents : ces dernières sont en effet insensibles à un traitement capable de provoquer la mort des plantules vertes. Seuls des traitements beaucoup plus sévères provoquent une inhibition sensible de la croissance des plantules étiolées.

La démonstration la plus claire nous a été donnée par la différence de comportement de plantules de sojas à l'obscurité — entre le 2^e et le 6^e jour suivant la mise en germination —, et placées à la lumière à partir du 6^e jour. Lorsqu'on les repique en pot, à la serre, les jeunes plantes présentent en effet un aspect très comparable à celui qu'elles avaient le 2^e jour : en particulier leurs cotylédons sont encore fermés. On ne peut donc attribuer à une pénétration plus aisée dans les tissus la différence d'activité entre ces deux périodes. La seule différence porte sur le verdissement des tissus à la lumière et le commencement de l'activité photosynthétique. Il est bien établi en effet que la réduction de la protochlorophylle en chlorophylle et la fixation active de CO₂ s'amorcent très rapidement — en quelques heures — dans des plantules étiolées, dès qu'elles se trouvent à la lumière (TOLBERT et GAILEY (98), BILLOT et LEROY (14)). Il est donc probable que la phosphorylation photosynthétique apporte rapidement aux phosphorylations oxydatives un complément de plus en plus important, d'autant plus qu'elle doit représenter pour les feuilles vertes une source d'ATP bien supérieure aux phosphorylations oxydatives (rendement (*) moyen avec des chloroplastes éclatés de l'ordre de 550 à 800; rendement (*)

(*) Rendement : $Q \text{ Pi (N)} = \mu\text{M}$ de phosphore minéral estérifié par mg N enzymatique par heure.

moyen de mitochondries d'origine diverse de 50 à 200) (ALLEN, WHATLEY, ARNON (1)).

L'inhibition observée entre le 6^e et le 10^e jour résulte donc bien d'un déficit énergétique causé par le désaccouplement des photophosphorylations. Il est d'ailleurs intéressant de noter que c'est surtout la formation des organes aériens qui est arrêtée dès cette période, alors que la croissance des racines n'est que partiellement inhibée tant qu'elle ne dépend pas exclusivement des produits de la photosynthèse. Cette formation des organes aériens serait donc plus particulièrement dépendante de l'ATP photosynthétique.

c) *Conséquences sur le métabolisme général*

Nos expériences ont montré que les 3 aspects du métabolisme général que nous avons étudiés sont profondément perturbés par le traitement avec la parachlorophényl-3-éthyl-5-oxazolidinedione-2.4. Les troubles du métabolisme glucidique (dégradation de l'amidon, baisse ultérieure des teneurs en sucres solubles), résultent clairement de l'inhibition de la formation d'hexoses phosphates, par l'intermédiaire de la phosphorylase.

Il en va de même pour le métabolisme azoté : nous avons vu que l'action essentielle dans ce domaine est l'inhibition complète de la synthèse des protéines. En effet l'expérience réalisée avec des cultures de tissus de topinambours montre bien que les transaminations se déroulent normalement en présence de la pCPEOD; par ailleurs les autres troubles du métabolisme observés dans les plantes entières (accumulation d'acides aminés libres et d'amides) peuvent être considérés comme des conséquences de l'arrêt de la protéosynthèse. Cette inhibition de la synthèse des protéines peut effectivement résulter, comme nous l'avons vu, du manque d'ATP photosynthétique (dans le cas des plantes entières) ou d'origine oxydative (dans le cas des cultures de tissus). On pourrait cependant se demander si la pCPEOD n'intervient pas également directement au niveau du processus de la protéosynthèse. L'absence totale d'inhibition de la croissance des plantules en germination à l'obscurité, aux mêmes doses, nous donne la preuve que cette hypothèse ne peut

être retenue, puisque les plantules traitées sont quand même le siège d'une protéosynthèse intense :

On peut donc bien considérer qu'aux doses normales d'emploi les troubles du métabolisme glucidique et azoté provoqués par la parachlorophényl-3-éthyl-5-oxazolidine dione-2.4 résultent exclusivement de son action sur la photophosphorylation.

La formation d'acides carboxyliques dans les plantes traitées reste par contre inexpliquée. Elle paraît liée à la protéolyse et à la disparition de l'amidon, mais les mécanismes en cause nous sont inconnus.

d) *Conclusion : mode d'action de la parachlorophényl-3-éthyl-5-oxazolidine-dione-2.4*

Nous avons vu que l'activité herbicide de la pCPEOD sur les plantules vertes se manifeste par un arrêt de leur croissance et ultérieurement par leur mort. Ces 2 phénomènes peuvent être considérés comme des conséquences du déficit en ATP.

L'arrêt de la croissance résulte évidemment de l'inhibition de la protéosynthèse, qui est presque complet 48 heures après le traitement. Il peut résulter également de ce que la croissance par auxesis nécessite l'intervention d'ATP (MARRE (63)).

La mort des plantes résulte probablement de l'arrêt de l'approvisionnement énergétique que provoque l'épuisement progressif des réserves glucidiques que nous avons observé.

Le mode d'action de la parachlorophényl-3-éthyl-5-oxazolidine-dione-2.4 nous paraît donc consister essentiellement dans l'inhibition de la photophosphorylation; cette action est manifeste *in vitro* sur des chloroplastes isolés; elle se traduit *in vivo* par une réduction très importante de la fixation photosynthétique de CO₂, par un épuisement progressif des réserves gluciques (amidon et sucres solubles) et par un arrêt de la protéosynthèse. Il en résulte un arrêt de la croissance et à la longue la mort de la plante.

2° MODE D'ACTION DES PHÉNYL-3-ALKYL-5-OXAZOLIDINE-DIONE

a) *Interaction avec la photosynthèse*

L'étude de l'inhibition de la fixation de CO_2 par des plantes entières nous a montré que 3 autres dérivés possèdent la même propriété que la pCPEOD, de freiner l'activité photosynthétique : il s'agissait, rappelons-le, des dérivés phényl-3-méthyl-5-(PMOD) métachlorophényl-3-méthyl-5-(mCPMOD)-parachlorophényl-3-méthyl-5 (pCPMOD). Nous avons également vu que, toujours sous réserve des seuils d'action, ces mêmes composés provoquent comme la pCPEOD une disparition progressive de l'amidon et des sucres solubles. Nous pouvons donc supposer que le mode d'action de ces 4 composés est identique. Il serait douteux que cette propriété ne soit pas partagée, toujours à des seuils d'activité différents, par les autres composés de cette famille qui sont au moins de bons inhibiteurs de croissance sinon de bons herbicides, et en particulier par les dérivés parachloro-substitués correspondant aux substitutions propyl et isopropyl sur le carbone 5 : ils provoquent en effet des symptômes extrêmement voisins de ceux du pCPEOD. Il est très probable également que dans tous les cas c'est le même effet de désaccouplement des photophosphorylations qui est responsable de l'activité herbicide.

Il serait intéressant de pouvoir comparer ce mode d'action à celui des phényl-carbamates d'alkyl, herbicides dont la structure est très voisine. MORELAND et HILL (70) ont étudié l'action de ces derniers sur la photoréduction du ferrieyanure par des chloroplastes isolés. Ils ont montré que pour la substitution métachlorophényl les esters des alcools méthylique à amylique inhibent fortement cette réaction, l'inhibition étant la plus forte pour le 3-chlorophényl-carbamate de secbutyl (80 % à $6 \cdot 10^{-4}\text{M}$). On ne trouve pas malheureusement de données correspondantes pour la série des dérivés parachlorosubstitués, de sorte qu'on ne connaît pas l'activité inhibitrice du 4-chlorophénylcarbamate de secbutyl, qui est le composé le plus proche de la pCPEOD. Par ailleurs ces auteurs n'ont pas inclus dans leurs protocoles expérimentaux l'addition des cofacteurs

de la phosphorylation (ADP, Pm, Mg^{++}); on ignore donc si les composés étudiés ont des propriétés désaccouplantes. La comparaison des propriétés des deux familles est donc malaisée.

Il est toutefois intéressant de noter l'hypothèse qu'ont émise ces auteurs pour rendre compte des propriétés inhibitrices des phénylcarbamates. Ils supposent que le groupement $NHC = O$ de la fonction carbamique serait susceptible de réaliser des liaisons hydrogène, avec les liaisons peptidiques des protéines liées à la chlorophylle (70). Précédemment WESSELS et VAN DER VEEN (106) avaient formulé une hypothèse voisine pour expliquer le mode d'action des phényl-uréthanes et des phényl-urées, faisant intervenir des liaisons hydrogènes entre le groupement $NH - C = O$ de ces inhibiteurs et le cycle cyclopentanone de la chlorophylle. MORELAND et HILL, dans une série d'études sur le mode d'action des herbicides (69, 71, 72, 73) généralisent cette hypothèse aux anilides et aux triazines. Dans ce dernier cas ils font intervenir le groupement $-NH - C = N -$ correspondant à la fonction amine des chaînes latérales et à l'azote adjacent du noyau s-triazine. Des liaisons hydrogènes seraient ainsi formées entre ces groupements actifs d'une part et les liaisons peptidiques des protéines liées à la chlorophylle, ou directement avec les substituants des atomes 9 et 10 du cycle cyclopentanone de la chlorophylle. L'adsorption des inhibiteurs sur les protéines inhiberait les transferts d'énergie entre les molécules de chlorophylle. La liaison directe avec la chlorophylle, bloquant l'atome d'hydrogène mobile lié au carbone 10 empêcherait son transfert et son remplacement par un hydrogène de l'eau (73). Une des bases expérimentales de cette hypothèse résulte de la très faible activité des composés dans lesquels l'hydrogène iminique est remplacé par un substituant alkyl ou stériquement inhibé par un atome de chlore en ortho sur le noyau phényl (70).

Il nous paraît conforme à cette théorie que le composé le plus phytotoxique de la famille des phényl-3 alkyl-5 oxazolidine-dione-2, 4, la pCPEOD, ne présente *in vitro* qu'une activité inhibitrice de la réaction de HILL faible ou nulle, aux concentrations les plus élevées que nous ayons expérimentées ($1.6.10^{-3}M$), puisque la cyclisation des phényl-carbamates d'acides en oxazolidine-diones entraîne l'élimination de l'hydrogène iminique.

b) *Action mitoclasique*

Cette action est pour les dérivés non substitués ou méta-chloro-substitués, une composante non négligeable de leur activité. C'est ainsi que la PMOD et la mCPMOD provoquent un ralentissement de la croissance de tomates ou de sojas à des doses (3 kg/ha pour mCPMOD, 6 kg/ha pour PMOD) où l'inhibition des photophosphorylations ne saurait intervenir. Les symptômes présentés par les plantes montrent clairement que c'est l'inhibition des mitoses qui est en cause. L'absence totale de telles propriétés chez les dérivés parachloro-substitués peut paraître assez surprenante. Cependant on sait que pour la colchicine par exemple une modification très faible de sa structure chimique peut entraîner une perte complète d'activité (l'isocolchicine par exemple est 100 fois moins active que la colchicine elle-même — d'après STEINEGGER et LEVAN, 1947, cités par DEYSSON (37)). Les relations structure-activité mitoclasique sont encore très mal perçues et dans ces conditions nous ne pouvons qu'enregistrer le fait constitué par l'absence d'action des dérivés para-chloro-substitués sans envisager aucune hypothèse explicative.

c) *Phytotoxicité générale de la famille des phényl-oxazolidine-diones*

Nous avons vu au chapitre III que l'étude de la phytotoxicité des 50 phényl-oxazolidine-diones dont nous disposions nous avait conduit à éliminer une quarantaine d'entre elles en raison de leur faible activité. Il est intéressant de noter que les composés correspondent soit à des thiazolidine-diones-2.4 (la substitution d'un atome de soufre à la place de l'oxygène 1 entraîne, les autres substitutions étant identiques, une perte complète d'activité), soit à des substitutions $R_1 = R_2 = H$ ou $R_1 = H$ $R_2 = \text{alkyl}$ supérieurs à C3 ou alkène ou cyclo-alkyl). Tout se passe comme si les substitutions autour du squelette phényl-oxazolidine-diones-2.4 définissaient un volume moléculaire optimum au-dessous et en dessus duquel il n'y a plus d'activité. Cette notion de volume moléculaire optimum a déjà été mise en évidence par HUFFMANN et ALLEN (52). Travail-

lant sur les modèles moléculaires d'un grand nombre d'herbicides actifs appartenant à des familles variées et de leurs homologues supérieurs et inférieurs, ces auteurs avaient trouvé qu'en dessous et au-delà d'un volume moléculaire optimum, le même pour un grand nombre d'herbicides très actifs (contenant tous un noyau phényl associé soit à un acide par un pont oxygène. — 24 D — soit à une fonction urée — CMU, DCMU — soit à une fonction carbamate ou anilide) l'activité baissait considérablement

Il semble que nous nous trouvions devant un phénomène analogue dans le cas des phényl-oxazolidine-diones et il est intéressant de noter que le volume moléculaire des phényl-oxazolidine-diones les plus actives paraît être du même ordre de grandeur que celui des herbicides du type CMU, 2.4 D ou CIPC.

En tout état de cause, il existe des herbicides très actifs appartenant à des familles très différentes (PCA = 1 phényl-4 amino-5-chloro-pyridazone-6; Diquat = 1.1'-éthylène-2.2'-dipyridylum) dont le volume moléculaire est sensiblement plus important, ou plus faible (aminotriazole et chloroacétamides). Il semble donc que ce soit dans le cadre des composés présentant une formule structurale assez bien définie — acides phénoxy-acétique, phényl-alkyl-urées, phényl-carbamates, etc. — que les observations de HUFFMANN et ALLEN soient valables. Mais dans ce cadre là il semble que l'activité de phényl-oxazolidine-dione réponde à des critères très voisins.

En conclusion, on peut diviser les phényl-3-alkyl-5-oxazolidine diones herbicides en 2 groupes :

1° Les mito-inhibiteurs : ils n'ont pas de substitution sur le noyau phényl ou ils sont métachloro-substitués; à la dose de 3 à 6 kilogrammes par hectare ils provoquent un ralentissement plus ou moins accentué de la croissance par inhibition du fonctionnement fusorial pendant la mitose. Ils sont alors actifs aussi bien sur des plantules de germination à l'obscurité que sur des plantes vertes à la lumière. Aux doses plus élevées leur action se double d'une intervention au niveau de la photosynthèse, analogue à celle des autres composés.

2° Ceux qui n'ont pas de propriétés mitoclasiques : ce sont les dérivés parachloro-substitués. Ils agissent exclusivement comme inhibiteurs de la phosphorylation photosynthétique et provoquent

de ce fait l'arrêt de la croissance des plantules vertes, par inhibition de la fixation photosynthétique de CO_2 et de la synthèse des protéines; ultérieurement les plantes meurent par épuisement des réserves glucidiques. Ils sont par contre sans action, aux doses normales, herbicides, sur des plantules en germination à l'obscurité.

Il reste que nous ignorons les raisons pour lesquelles les différents composés ont des seuils d'activité *in vivo* aussi variables. Il peut s'agir aussi bien d'une différence dans les possibilités de pénétration et de translocation sur les sites actifs, que d'activité variable pour une même quantité de composés présents dans les cellules chlorophylliennes. Il est certain que ces différents composés ont des solubilités très différentes dans divers solvants organiques, donc des balances lipophile-hydrophile très variables, ce qui peut justifier que leur pénétration, leur migration de la plante et leur fixation sur les sites sensibles soient si différentes. Mais nous sommes ici dans le domaine de la recherche des voies de pénétration et de migration de ces herbicides dans les plantes, qui sort du cadre de notre étude tel que nous nous l'étions fixé.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ALLEN (M. B.), WHATLEY (F. R.) et ARNON (D. I.). — Photosynthesis by isolated chloroplasts VI Rates of conversion of Light into chemical energy in Photosynthetic phosphorylation. *Bioch. Bioph. Acta.*, 1958, **27**, 16-23.
- (2) ANDREJEW (A.), DUCET (G.), LOVW (G.) et ROSENBERG (A. J.). — Action de la chlorpromazine, du soneryl et du penthiobarbital sur les phosphorylations oxydatives. *C. R. Soc. Biol.*, 1956, **50**, 484-486.
- (3) ARNON (D. I.). — Extracellular Photosynthetic Reactions. *Nature*, 1951, **167**, 1008-1010.
- (4) ARNON (D. I.), WHATLEY (F. R.) et ALLEN (M. B.). — Photosynthesis by isolated chloroplasts II Photosynthetic Phosphorylation : Conversion of Light into phosphate Bond energy. *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, **76**, 6324-6329.
- (5) ARNON (D. I.), ALLEN (M. B.) et WHATLEY (F. R.). — Photosynthesis by isolated chloroplast. IV. — General Concept and Comparison of three photochemical Reactions. *Bioch. Bioph. Acta.*, 1956, **20**, 449-461.
- (6) ARNON (D. I.), WHATLEY (F. R.) et ALLEN (M. B.). — Triphosphopyridine nucleotide as a catalyst of Photosynthetic Phosphorylation. *Nature*, 1957, **180**, 182-185.
- (7) ARNON (D. I.), WHATLEY (F. R.) et ALLEN (M. B.). — Assimilatory Power in Photosynthesis : Photophosphorylation by isolated chloroplasts is coupled with TPN reduction. *Science*, 1958, **127**, 1026-1034.
- (8) ARNON (D. I.), LOSADA (M.), WHATLEY (F. R.), TSUJIMOTO (H. Y.), HALL (D. O.) et HORTON (A. A.). — Photosynthetic Phosphorylation and mollecular oxygen. *Proc. Nl. Ac. Sc.*, 1961, **47**, 1314-1340.
- (9) ASHTON (F. M.), URIBE (E. G.) et ZWEIG (G.). — Effect of Monuron on $^{14}\text{CO}_2$ fixation by Red Kidney Bean Leaves. *Weeds*, 1961, **9**, 575-579.
- (10) BASSHAM (J. A.) et CALVIN (M.). — The path of Carbon in Photosynthesis. Prentice Hall. 1957.
- (11) BELJANSKI (M.). — Ribonucleasides. Triphosphates et synthèses de peptides spécifiques par des enzymes purifiés. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1961, **43**, 1017-1030.
- (12) BILLAZ (R.) et MOREL (G.). — Action mitoclassique de diverses oxazolidine diones 2.4. *C.R.A.S.*, 1961, **253**, 2248-2250.
- (13) BILLAZ (R.), GOFFEAU (A.) et BOVE (J. M.). — Le Parachlorophenyl 3-éthyl-5-oxazolidine-dione-2.4 inhibiteur de la Phosphorylation synthétique. *C.R.A.S.*, 1963, **256**, 4960-4962.
- (14) BILLOT (J.) et LEROY (C.). — Sur la genèse des Pigments et l'activité photosynthétique des feuilles étiolées de Phaseolus Vulgaris au cours du verdissement. *Rev. Gen. Bot.*, 1960, **67**, 477-522.
- (15) BISCHOP (N. I.). — The influence of the herbicide DCMU on the oxygen evolving System of Photosynthesis. *Bioch. Bioph. Acta*, 1958, **27**, n° 1, 205-206.
- (16) BLACKMAN (G. E.). — Studies on the principle of Phytotoxicity. I The assesment of relative toxicity. *J. of Exp. Bot.*, 1952, **3**, 1-27.
- (17) BONNER (W.) et BONNER (J.). — The role of Carbon dioxide in acid formation by succulent plants. *Am. J. Botany*, 1948, **36**, 113-117.
- (18) BONNER (J.). — Plant Biochemistry. *Ac. Press. N. Y.*, 1950, 222-223.
- (19) BONNER (J.). — Plant Biochemistry. *Ac. Press. N. Y.*, 1950, 299-308.
- (20) BOVE (J.), BOVE (C.) et RAVEUX (R.). — Extraction, séparation et détermination de certains composés hydrosolubles dans les plantules et diverses cultures de tissus de Citrus limomum. *Rev. Gen. Bot.*, 1957, **64**, 572-592.
- (21) JOYE (J.) et RAVEUX (R.). — La séparation et la détermination des acides carboxyliques de C_1 à C_6 par chromatographie de partage sur gel de silice. II. — Nouvelle technique proposée. *Bull. Soc. Chim. F.*, 1957, 376-381.
- (22) BURRIS (R. H.). — Nitrogen Nutrition. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 1959, **10**, 301-327.
- (23) BURSTROM (H.). — The nitrate nutrition of Plants : a general survey of the occurrence and assimilation of nitrate. *Ann. Royal Agr. College of Sweden*, 1946, **13**, 1-82.

- (24-25) CHEFTEL (R. I.), MUNIER (R.) et MACHEBŒUF (M.). — Microchromatographie sur papier des acides aliphatiques hydro-solubles et non volatiles (II) (III). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1952, **34**, 380-387; 1953, **35**, 1085-1089.
- (26) CHINARD (F. P.). — Photometric estimation of Proline and Ornithine. *J. Biol. Chem.*, 1952, **199**, 91-95.
- (27) CHOUTEAU (J.). — Les équilibres acide-base du tabac Paraguay. *Thèse* 27 juin 1960. Fac. des Sciences de Bordeaux.
- (28) CLARK (H. E.). — Effect of Ammonium and of Nitrate Nitrogen on the composition of tomato plants. *Plant Phys.*, 1936, **11**, 5-22.
- (29) COIC (Y.), LESAIN (C.) et LEROUX (F.). — Effets de la nutrition ammoniacale ou nitrrique de l'alimentation azotée et du changement de la nature de cette alimentation sur le métabolisme des anions et des cations chez la tomate. *Ann. Phys. Vég.*, 1962, **4**, 117-125.
- (30) COLOMBO (P.), CORBETTA (D.), PIROTTA (A.), RUFFINI (G.) et SAROTTI (A.). — A solvent for qualitative and quantitative determination of sugars using paper chromatography. *J. of Chrom.*, 1960, **3**, 343-350.
- (31) COMBES (R.). — Communication à la Sté Française de Physiologie Vég., 9 mars 1963 (sous presse).
- (32) COOKE (A. R.). — A possible mechanism of action of the Urea type Herbicides. *Weeds*, 1956, **4**, 397-398.
- (33) CRAFTS (A. S.). — Chemistry and Mode of Action of Herbicides. I. S. Publ. N. Y. 1961.
- (34) CRUIKSHANK (D. H.) et WOOD (J. G.). — The metabolism of starving leaves : VI Nitrogen balance sheet and changes in organic acid content during starvation. *Aust. Journ. exp. Biol. Med. Science*, 1945, **23**, 243-247.
- (35) DEDONDER (R.). — Les glucides du topinambour. — II. Rapports entre la composition glucidique des tubercules du Topinambour et les produits d'hydrolyse de l'inuline. *C.R.A.S.*, 1950, **230**, 997-998.
- (36) DELSAL (D. L.) et MANHOURI (H.). — Étude comparative des dosages colorimétriques du Phosphore. — IV. Dosage de l'orthophosphate en présence d'esters phosphoriques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, **40**, 1623-1626.
- (37) DEYSSON (G.). — Les facteurs de la mitoinhibition végétale in « Les facteurs de la croissance cellulaire ». Masson, Paris, 1956.
- (38) DIMLER (R. J.), SCHAEFFER (W. C.), WISF (C. S.) et RIST (C. E.). — Quantitative paper chromatography of d. Glucose and its Oligosaccharides. *Anal. Chem.*, 1952, **24**, 1411-1414.
- (39) DURANTON (H.). — Étude du métabolisme de l'arginine libre dans les tissus du topinambour cultivé *in vitro*. *Thèses Paris*, 21 février 1959.
- (40) EXER (B.). — Über Pflanzenwachstums regulatoren : Der Einfluss von Simazin auf den Pflanzenstoffwechsel. *Experimentia*, 1958, **14**, 136-137.
- (41) FORTI (G.) et PARISI (B.). — Sur l'existence de la photophosphorylation cyclique *in vivo* chez les plantes supérieures. *Bull. Soc. Fr. Phys. Vég.*, 1962, **8**, 41-45.
- (42) GAUTHERET (R. J.). — La culture des tissus végétaux. Masson Paris, 1959.
- (43) GIBBS (M.). — The position of C¹⁴ in sunflower leaf metabolites after exposure of leaves to short periods photosynthesis and darkness in an atmosphere of ¹⁴CO₂. *Plant Physiology*, 1951, **26**, 549-556.
- (44) GOFFEAU (A.) et BOVE (J. M.). — Réactions photosynthétiques de chloroplastes isolés de Brassica Chinensis. *C.R.A.S.*, 1952, **255**, 2644-46.
- (45) GREGORY (F. G.) et SEN (P. K.). — Physiological studies in Plant Nutrition : IV. The relation of respiration rate to the carbohydrate and Nitrogen metabolism of the barley leaves as determined by nitrogen and potassium deficiency. *Ann. Bot.*, 1937, n. s. 1, 521-561.
- (46) HACKETT (D. P.). — Respiratory Mechanisms in Higher Plants. *Ann. Rev. Plant. Phys.*, 1959, **10**, 113-146.
- (47) HANES (C. S.). — The reversible formation of Starch from Glucose-1-Phosphate catalysed by potato phosphorylase. *Proc. Roy. Soc. (London)*, 1940, B **129**, 174-208.
- (48) HANES (C. S.). — Enzymic synthesis of Starch from Glucose-1-Phosphate. *Nature London*, 1940, **145**, 348-349.
- (49) HASSID (W. Z.) et ABRAHAM (S.). — Chemical Procedures for Analysis of Polysaccharids : Determination of Starch. *Methods in Enzymology*, **111**, 38-40.

- (50) HILTON (J. L.), JANSEN (L. L.) et HULL (H. L.). — Mechanisms of Herbicide Action. *Ann. Rev. Plant. Phys.*, 1963, **14**, 353-384.
- (51) HOAGLAND (M. B.). — An enzymatic mechanism for amino acid activation in animal tissues. *Bioch. Bioph. Acta.*, 1955, **16**, 228-229.
- (52) HUFFMAN (C. W.) et ALLEN (S. E.). — Molecular Size VS Herbicidal Activity of Anilides. *Agr. and Food Chem.*, 1960, **8**, 298-302.
- (53) IVENS (C. W.) et BLACKMAN (G. E.). — Inhibition of Growth of apical meristems by ethyl phenyl carbamates. *Nature (G. B.)*, 1950, **166**, 954-955.
- (54) KANDLER (O.), LIESENKOTTER (I.) et OAKS (B. A.). — Die Wirkung von monodessigsäure auf Atmung und Photosynthese von Chlorella. *Z. Naturforschung B. Dtsch.*, 1961, **16**, 50-61.
- (55) KEY (J. L.), HANSON (J. B.) et BILS (R. F.). — Effect of 24 D application on activity and composition of mitochondria from soybean. *Plant Phys.*, 1960, **35**, 177-183.
- (56) KINGDON (H. S.), WEBSTER (L. T.) et DAVIE (E. D. Jr.). — Enzymatic formation of adenylyl tryptophan : isolation and identification. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, 1958, **44**, 757-765.
- (57) LANGERON (M.). — Précis de Microscopie. Masson, Paris, 1942.
- (58) LEVY (A. L.) et CHUNG (G. B.). — Two dimensional chromatography of amino acids on buffered papers. *An. Chem.*, 1953, **15**, 396-399.
- (59) LONGCHAMP (R.). — Le desherbage chimique en France. Situation actuelle et perspectives d'avenir. *Ann. Phys. Vég.*, 1962, **4**, 169-185.
- (60) LOOMIS (W. F.) et LIPMANN (F.). — Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxydation. *J. Biol. Chem.*, 1948, **173**, 807-808.
- (61) LOSADA (M.), TREBST (A. V.) et ARNON (D. I.). — Photosynthesis by isolated chloroplasts XI CO₂ Assimilation in a reconstituted chloroplast system. *J. of Biol. Chem.*, 1960, **235**, 832-839.
- (62) MAC PHERSON (H. T.). — The basic aminoacid content of Proteins. *Bioch. Journ.*, 1946, **40**, 470-481.
- (63) MARRE (E.). — Phosphorylation in Higher Plants. *Ann. Rev. Plant Phys.*, 1961, **12**, 210.
- (64) MASSINI (P.). — Uptake and translocation of 3 amino and 3 hydroxy 1.2.4. triazole in plants. *Proc. Int. Conf. Peaceful Uses Atm. Energy*, 2d meeting 1959, **27**, 58-62.
- (65) MENORET (Y.). — Action de l'ac. 2.4-dichlorophenoxy-acétique sur le métabolisme azoté des tissus de carotte cultivées *in vitro*. Thèses, Paris, 23 janvier 1960.
- (66) MENORET (Y.), BILLAZ (R.) et MOREL (G.). — Une nouvelle classe de substances herbicides : les oxazolidine diones. *C.R.A.S.*, 1962, **254**, 546-548.
- (67) MOREL (G.). — Métabolisme de l'arginine par les tissus de Crown Gall de Topinambours. *Bull. Soc. Fr. de Phys. Vég.*, 1956, **2**, 75.
- (68) MOREL (G.). — Les oxazolidine-diones, une nouvelle famille d'herbicides sélectifs. *Comptes rendus des journées d'études sur les herbicides*, 52-56. EWRC. Colluma Paris, 13-15 décembre 1961.
- (69) MORELAND (D. E.), GENTNER (W. A.), HILTON (L. J.) et HILL (K. L.). — Studies on the mecanism of herbicidal action of 2-chloro-4-6 bis-(ethylamino) s-triazine. *Pl. Phys.*, 1959, **34**, 432-435.
- (70-71-72-73) MORELAND (D. E.) et HILL (K. L.). — The action of Alkyl N Phenyl-carbamate on the Photolytic activity of Isolated chloroplasts. *Ag. and Food Chem.*, 1959, **7**, 832-837.
Inhibition of the Photochemical activity of isolated chloroplasts by ring chlorinated N phenyl 2 methyl pentanamides. *Abstracts Weed S. A.*, 1960, 41-42.
Interference of herbicides with the Hill reaction of isolated chloroplasts. *Weeds*, 1962, **10**, 229-236.
Inhibition of Photochemical activity of isolated chloroplasts by acylanilids. *Weeds*, 1963, **11**, 55-60.
- (74) MORRIS (D. L.). — Quantitative determination of Carbohydrates with Dreywood's Anthrone Reagent. *Science*, 1948, **107**, 254-255.
- (75) MORRIS (M. P.) et GONZALES MAS (A.). — A simple colorimetric method for the determination of nitrates in forage crops. *Ag. and Food Chemistry*, 1958, **6**, 456-457.

- (76) MOTHES (K.). — Die Vakuum in filtration im Ernährungsversuch (dargestellet an Untersuchen über die Assimilation des Ammoniaks). *Planta*, 1933, **19**, 117-138. Cité par MOYSE (78).
- (77) MOYSE (A.). — Respiration et Métabolisme azoté. Paris 1950. Hermann et Cie Ed.
- (78) MOYSE (A.). — Le métabolisme protidique des plantes (2^e partie). *L'Année Biologique*, 3^e série, 1951, **27**, 581-649.
- (79) NAYLOR (A. W.) et DAVIS (E. A.). — *Am. Soc. Plant. Phys. Proc.*, 24 th meeting, 1949, 13.
- (80) NELSON (N.). — A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of Glucose. *J. Biol. Chem.*, 1944, **153**, 375-380.
- (81) PARTRIDGE (S. M.). — Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. *Nature*, 1949, **164**, 443.
- (82-83) PIERPOINT (W. S.). — Mitochondrial preparation from the leaves of Tobacco *The Bioch. Journal.*, 1959, **71**, 518-528.
Id. II : Oxidative Phosphorylations. *The Bioch. Journal*, 1960, **75**, 504-511.
- (84) PUCHER (G. W.), LEAVENWORTH (C. S.) et VICKERY (H. B.). — Determination of Starch in plant tissues. *Anal. Chem.*, 1948, **20**, 850-853.
- (85) PUCHER (G. W.) et VICKERY (H. B.). — The metabolism of the organic acids of tobacco leaves in solution of organic acid salts. *J. Biol. Chem.*, 1949, **178**, 557-575.
- (86) RACUSEN (D.). — The metabolism and Translocation of 3-Aminotriazole-1.2.4. in Plants. *Arch. Bioch. Bioph.*, 1958, **74**, 106-113.
- (87) SAMPFORD (M. R.). — Studies on the principle of Phytotoxicity. — II. Experimental designs and Techniques of statistical analysis for the assesment of Phytotoxicity. *J. of Exp. Bot.*, 1952, **3**, 28-46.
- (88) SCHNEIDER (W. C.) et HOGEBOOM (G. H.). — Intracellular distribution of enzymes V : Further Studies on the distribution of cyt. c. in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.*, 1950, **183**, 123-128.
- (89) SEN (S. P.) et LEOPOLD (A. C.). — Influence of Light and Darkness upon carbon dioxide fixation. *Pl. Phys.*, 1956, **31**, 323-329.
- (90) STENLID (G.) et SADDIK (K.). — The effet of some Growth Regulators and Uncoupling Agents on Oxidative Phosphorylation in mitochondria of Cucumbers Hypocotyls. *Phys. Plant*, 1962, **15**, 369-379.
- (91) STILLER (M.). — The path of Carbon in Photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiology*, 1962, **13**, 151-170.
- (92) SWITZER (C. M.). — Effects of Herbicides and related chemicals on oxydation and phosphorylation by isolated soybean mitochondria. *Pl. Phys.*, 1957, **32**, 42-44.
- (93) TAGAWA (K.), TSUJIMOTO (H. Y.) et ARNON (D. I.). — Role of chloroplast Ferredoxin in the energy conversion process of Photosynthesis. *Proc. Nl. Acad. Sc.*, 1963, **49**, 567-572.
- (94) TEMPLEMAN (W. G.) et SEXTON (W. H.). — Action de quelques esters aryl-carbamiques et de substances voisines sur les céréales et d'autres végétaux. *Nature*, 1945, **156**, 630.
- (95-96) THOMPSON (J. F.), ZACHARIUS (R. M.) et STEWARD (F. C.). — Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in Plants.
I. — The reaction of nitrogen compounds with ninhydrin on paper : a quantitative procedure. *Pl. Phys.*, 1951, **26**, 375-398.
II. — Variables in two dimensional paper chromatography of amino acids : a quantitative procedure. *Pl. Phys.*, 1951, **26**, 421-441.
- (97) THURLOW (J.) et BONNER (J.). — Fixation of atmospheric CO₂ in the dark by leaves of Bryophyllum. *Arch. Bioch.*, 1948, **19**, 509-511.
- (98) TOLBERT (N. E.) et GALEY (F. B.). — CO₂ fixation by etiolated plants after exposure to white light. *Plant Phys.*, 1955, **30**, 491-499.
- (99) TOLMACH (L. J.). — Effects of triphosphopyridine nucleotide upon oxygen evolution and carbon dioxide fixation by illuminated chloroplasts. *Nature*, 1951, **167**, 946-948.
- (100) TOLMACH (L. J.). — The influence of Triphosphopyridine nucleotide and other physiological substances upon oxygen evolution from illuminated chloroplasts. *Arch. Bioch. Bioph.*, 1951, **33**, 120-142.

- (101) TREBST (A. V.), TSUJIMOTO (H. Y.) et ARNON (D. I.). — Separation of Light and Dark Phases in the Photosynthesis of isolated chloroplasts. *Nature*, 1958, **182**, 351-355.
 - (102) TREBST (A. V.), LOSADA (M.) et ARNON (D. I.). — Photosynthesis by isolated chloroplasts : X Dependence of CO₂ assimilation on the Photochemical Reactions of chloroplasts. *J. Biol. chem.*, 1959, **234**, 3055-3062.
 - (103) TREBST (A. V.), LOSADA (M.) et ARNON (D. I.). — Photosynthesis by isolated chloroplasts. — XII. Inhibitors of CO₂ Assimilation in a reconstituted chloroplast system. *J. of Biol. Chem.*, 1960, **235**, 840-844.
 - (104) VICKERY (H. B.), FUCHER (G. W.), SCHOENHEIMER (R.) et RITTENBERG (D.). — The assimilation of ammonia nitrogen by the tobacco plants : a preliminary study with isotopic nitrogen. *Journ. Biol. Chem.*, 1940, **135**, 531-539.
 - (105) VISHNIAC (W.) et OCHOA (S.). — Photochemical reduction of pyridine nucleotides by spinach grana and coupled carbon dioxide fixation. *Nature*, 1951, **167**, 768-769.
 - (106) WESSELS (J. S. C.) et VAN DER VEEN (R.). — The action of Some derivatives of 3 Phenyl 1.1. dimethylurea on the Hill reaction. *Bioph. Bioch. Acta*, 1956, **19**, 548-549.
 - (107) WHATLEY (F. R.), ALLEN (M. B.), ROSENBERG (L. L.), CAPINDALE (J. B.) et ARNON (D. I.). — Photosynthesis by isolated chloroplasts. — V. Phosphorylation and Carbon Dioxiden. Fixation by broken Chloroplasts. *Bioch. Bioph. Acta.*, 1956, **10**, 462-468.
 - (108) WHATLEY (F. R.), ALLEN (M. B.) et ARNON (D. I.). — Photosynthesis by isolated chloroplasts VII Vitamin K and Riboflavin Phosphate as cofactors of cyclic Photophosphorylation. *Bioch. Bioph. Acta*, 1959, **32**, 32-46.
 - (109) WOOD (J. G.), CRUICKSHANK (D. H.) et KUCHEL (R. H.). — The metabolism of starving leaves (1.2.3.). *Aust. Journ. Exp. Biol. Med. Sc.*, 1943, **21**, 37-53.
 - (110) WOOD (J. G.), MERCER (F. V.) et PEDLOW (C.). — The metabolism of starving leaves (4). *Aust. Journ. Exp. Biol. Med. Sc.*, 1944, **22**, 37-43.
 - (111) YOVANOVITCH (A.). — Microdosage de l'ammoniaque. Application au dosage de l'ammoniaque urinaire. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1925, **7**, 665-672.
-

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

LA PHOSPHORILATION PHOTOSYNTHÉTIQUE

Vu et approuvé :

Paris, le 15 Février 1966

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Vu
et Permis d'imprimer

**Le Recteur de l'Académie
de Paris,**

— Imprimé par l'Imprimerie Alençonnaise —
Place Poulet-Malassis - 61 - Alençon - France

Dépôt légal — 2^e trimestre 1966
